

**Untersuchungen über die
Volumenbestimmung von Zellen
nach dem Widerstandsmeißprinzip
von Coulter**

von
Odila Zang
aus Oppeln

München 1965



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555228_0025



Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München

Direktor: Prof. Dr. A. Butenandt

Untersuchungen über die Volumenbestimmung von Zellen
nach dem Widerstandsmeßprinzip von Coulter

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Odila Zang

aus Oppeln

München 1965

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. G. Ruhenstroth-Bauer

Mitberichterstatter: Professor Dr. A. Butenandt

Dekan: Professor Dr. O. Hug

Mündliche Prüfung: 19. 10. 1965

Diese Arbeit wurde in der Zeit von November 1960
bis Dezember 1964 am Max-Planck-Institut für
Biochemie durchgeführt.

Ich danke Herrn Professor Dr. Butenandt und
Herrn Professor Dr. Ruhenstroth-Bauer für die
gestellte Aufgabe und die wohlwollende und
großzügige Förderung der Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
<u>Verfahren zur Messung von Erythrozyten</u>	2
Halbautomatische und automatische Verfahren zur Ermittlung des Zellvolumens	4
1. Optisch - elektronische Verfahren	4
a) Fotoelektrische Abtastung von Zählkammer	4
b) Abtastung eines Flüssigkeitsstrahles	5
c) Streulichtmessung	5
2. Das Leitfähigkeitsmessprinzip	6
<u>Schwierigkeiten in der Anwendung des Coulterschen Geräts</u>	8
<u>Entwicklung eines neuen Geräts</u>	12
<u>Untersuchungen mit dem Coulterschen Gerät Modell A</u>	16
1. Verwendung unpolarisierbarer Kupfer- sulfatelektroden	16
2. Weiterführung der Koinzidenzversuche	17
3. Aufstellung einer Normalverteilungskurve menschlicher Erythrozyten	18
<u>Physikalische Untersuchungen mit Versuchsauf- bauten zu einem neuen Gerät.</u>	20
1. Bestimmung der Kapillardimensionen	20
2. Bestimmung der Strömungsgeschwindigkeit und der Durchtrittszeit der Zellen	21
3. Darstellung von Einzelimpulsen und Impulsfolgen	22
4. Widerstandsmessung am Kapillarsystem	23

Biologische Untersuchungen mit dem neuen Gerät 25

1. Gipfelvolumen einer Erythrozytenpopulation
vor und nach Kapillarpassage 26
2. Zusammenhang zwischen Gipfelvolumen und Auf-
bewahrzeit einer Erythrozytenpopulation 26
3. Zusammenhang zwischen Aufschwemmungsdauer
in physiologischer Kochsalzlösung und Gipfel-
volumen einer Erythrozytenpopulation. 27
4. Zusammenhang zwischen Gipfelvolumen einer
gewaschenen und ungewaschenen Erythrozyten-
population
5. Einfluß des gerinnungshemmenden Mittels auf 29
das Gipfelvolumen einer Erythrozytenpopulation
6. Volumensverteilungskurve von Mischpopulationen 30
7. Einfluß verschiedener Kapillardurchmesser 31
8. Vermessung anders geformter Zellen. 32

Diskussion 36

Zusammenfassung 51

Abbildungen 52

Literatur 60

Die zellulären Elemente des Blutes wurden bereits im 17. Jahrhundert von dem holländischen Forscher LEUWENHOEK (1), entdeckt. Seither beschäftigen sich Naturwissenschaftler und Mediziner in steigendem Maße mit der Physiologie und Pathologie dieser Zellen. Sie bilden ein Organsystem ohne Gewebsverband und sind als frei zirkulierende Zellen dem Untersucher leicht zugänglich.

Zahlreiche Erkrankungen des menschlichen Organismus werden durch Störungen im Blut und dem blutbildenden System verursacht. Veränderungen von Zahl, Funktionsfähigkeit oder Form der Zellen begleiten im allgemeinen solche Störungen, deshalb ist ihre genaue Zählung, Differenzierung und Formanalyse erforderlich.

Einen großen Raum nehmen auf diesem Gebiet die Zählung- und Größenbestimmung von Erythrozyten ein. Die ersten Zählungen wurden 1852 von VIERORDT (2), die ersten Größenverteilungsbestimmungen 1920 von PRICE-JONES (3) vorgenommen. Diese beiden klinisch wichtigen Untersuchungen werden bis heute in grundsätzlich unveränderter Form ausgeführt. Sie gehören jedoch zu den mit dem größten subjektiven Fehler belasteten Routinemethoden im klinischen Laboratorium.

Erst die Entwicklung elektronischer Geräte in den letzten 15 Jahren brachte auf diesem Gebiet entscheidende Fortschritte. Eines der besten Verfahren wurde von Coulter (4) entwickelt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden: 1.) Physikalische und biologische Untersuchungen mit dem Coulterschen Zählgerät (Modell A, Seriennummern 628 und 635).

- 2) Messungen zur Erprobung von Versuchsaufbauten für ein neues Gerät.
- 3) Vergleichende Untersuchungen zwischen dem Coulter-schen und einem eigenen Gerät.
- 4) Weitere biologische Untersuchungen mit dem neuen Volumenmeßgerät.

Verfahren zur Messung von Erythrozyten.

Für die Zählung der Erythrozytenkonzentration unter dem Mikroskop wurden von BUECKER (5) und anderen Zählkammern entwickelt, die noch heute im Gebrauch sind. Diese Zählweise ist mit zahlreichen Fehlerquellen behaftet, deren Auswirkung sowohl von der Meßanordnung selbst, als auch von der Geschicklichkeit des Untersuchenden, abhängt. Die systematischen Fehler sind vor allem in Abweichungen der Dimension von Kammer und Verdünnungspipette, unregelmäßigem Einfließen und Konvektionsströmungen, die zu einer nicht statistischen Verteilung der Zellen führen und sich überlagernden Zellen zu suchen. Den subjektiven Anteil der Fehlerquellen bilden Pipettierfehler und abzunehmende Konzentration des Untersuchers. Der Pipettierfehler läßt sich auch bei den modernen Verfahren nicht vermeiden, da in jedem Fall eine exakte Verdünnung nötig ist. Der Ermüdungsfehler des Zählenden, der den größten Teil der Problematik der Kammerzählung bildet, fällt dagegen bei der Automatisierung des Vorganges weg.

Ebenso problematisch ist die Größenbestimmung von Zellen. PRICE-JONES bestimmte okularmikrometrisch den größten und kleinsten Durchmesser einer statistisch ausreichenden Zahl von Zellen. Die Mittelwerte der Durchmesser wurden

graphisch aufgetragen. Die erhaltene Kurve ergab einen Überblick über mittlere Zellgröße und Streuung der untersuchten Zellpopulation. Je mehr diese Untersuchung als wertvolles diagnostisches Hilfsmittel in der Klinik eingeführt wurde, um so störender wirkte sich die Tatsache aus, daß sich die gerade bei pathologischen Blutbildern häufig auftretenden erheblichen Zellverformungen damit nicht erfassen lassen. Methodische Schwierigkeiten liegen in den erheblichen Unterschieden der gefundenen Zelldurchmesser, je nachdem, ob die Messungen an einem Nativpräparat, einem getrockneten Ausstrich oder einer photographischen Vergrößerung vorgenommen werden. Bei dem von PRICE-JONES angegebenen Verfahren wird jedes noch so verformte Projektionsbild einer Zelle rechnerisch durch Ausmittlung des größten und kleinsten Durchmessers in eine Kreisform übergeführt. Es wurden deshalb von zahlreichen Autoren Verbesserungen vorgeschlagen, die hauptsächlich aus rechnerischen, bzw. graphischen Kunstgriffen bestanden, die Entrundung pathologischer Zellen besser zum Ausdruck zu bringen.

GUENTHER (6,7) wandelte die Zellfläche in eine Ellipse um, und bestimmte deren numerische Exzentrizität. HERNBERG (8) bestimmte die beiden größten senkrecht aufeinander stehenden Zellachsen und bezeichnete deren Differenz als Poikilozytosegrad, andere Autoren trugen beide Werte als getrennte Kurven auf.

Eine elegante Methode zur Bestimmung des mittleren Zelldurchmessers, die bereits Einzelmessungen ersparte, wurde zuerst von YOUNG 1913 beschrieben. Sie geriet dann in Vergessenheit und wurde von PIJPER 1918 (9) wieder entdeckt. BOCK (10) entwickelte auf diesen Grundlagen aufbauend sein Erythrozytometer: Bei dieser Methode wird das Licht zweier

punktförmiger Lichtquellen durch den Zellausstrich auf eine Mattscheibe geschickt. Da ein dünner Ausstrich die Eigenschaften eines optischen Gitters hat, entstehen farbige Beugungsringe, die umso kleiner werden, je größer die Zelldurchmesser sind. Verstellt man die ursprünglichen Lichtquellen solange bis sich die Farbringe berühren, so läßt sich halometrisch auf einem geeichten Mikrometer der mittlere Zelldurchmesser direkt in μ ablesen. Die Streubreite der Population bleibt allerdings unberücksichtigt und macht sich lediglich bei einer starken Anisozytose in einer Unschärfe der Beugungsringe bemerkbar.

Halbautomatische und automatische Verfahren zur Ermittlung des Zellvolumens.

Man unterscheidet optisch-elektronisch und rein elektronisch arbeitende Geräte. Die ersteren automatisieren entweder das Zählkammerprinzip (a), tasten einen feinen Suspensionsstrahl ab (b) oder arbeiten als Streulichtfotometer (c). Die rein elektronisch arbeitenden Geräte beruhen auf der Messung der Leitfähigkeitsdifferenz zwischen einer isotonischen Suspensionsflüssigkeit und den Zellen.

1. Optisch-elektronische Verfahren

a) Fotoelektrische Abtastung von Zählkammern.

Bei diesem von LAGERCRANTZ (11) und WOLFF (12) entwickelten Verfahren werden Blutproben üblicher Verdünnung in eine, durch eine Automatik stetig verschiebbare Zählkammer gebracht und durch mikroskopische Vergrößerung im Dunkelfeld dargestellt. Durch eine Spaltblende wird ein schmaler Bereich von der Größe einiger Teilchendurchmesser ausgesucht, so daß bei Bewegung der Zählkammer die Teilchen nacheinander den Schlitz passieren und gezählt werden. Das Bild gelangt auf eine Photokathode mit einem Sekundärelektronenvervielfacher, die entstehenden Impulse werden verstärkt und ge-

langen über einen Diskriminator mit variabler Vorspannung zur Auszählung. So wird eine grobe Erfassung der Größenverteilung der Zellen ermöglicht. Bei Einschaltung mehrerer Kanäle mit unterschiedlicher Diskriminatorspannung und damit Zählstufe können gleichzeitig verschieden hohe Impulsgruppen gezählt werden.

b) Abtastung eines Flüssigkeitsstrahls.

Diese Methode wurde hauptsächlich von CROSLAND-TAYLOR (13) entwickelt. Zur Zählung wird die Modulation eines scharf gebündelten Lichtstrahles durch einen ihn kreuzenden feinen Strahl der Suspensionsflüssigkeit ausgenützt. Dieser Flüssigkeitsstrom überschreitet nur wenig die Breite eines Teilchendurchmessers, so daß die Zellen den Lichtstrahl nacheinander unterbrechen. Der Lichtstrahl liegt in der optischen Achse eines Mikroskopes, welches die Teilchen vergrößert auf einer Fotozelle abbildet. Die der Teilchengröße entsprechenden Impulse werden verstärkt und gezählt. Der Vorteil dieser Methode gegenüber der vorigen liegt in einer Verringerung des Zählfehlers.

c) Streulichtmessung.

Bereits PONDER und BLUM (14) versuchten Erythrozytenkonzentrationen anhand der Abschwächung eines die Blutaufschwemmung durchlaufenden Lichtbündels zu bestimmen. LOESCHKE und WEVER (15) entwickelten daraus eine Methode, die die Konzentrationsbestimmung von Blutsuspensionen durch Auswertung der Lichtstreuung erlaubt. Da in die Konzentrationsbestimmung einer solchen Suspension sowohl die Hämoglobinkonzentration als auch Formfaktoren der Zellen eingehen, ist die erhaltene Extinktion ein Gemisch von Streulichtverlust und Trübungsabsorption. Dieses Verfahren wurde von KLEINE (25) entscheidend verbessert. Er suspendiert die Erythrozyten in

Gowersscher Lösung, wobei die Zellen Kugelgestalt annehmen. Monochromatisches Licht wird durch eine Sammellinse auf das inaktive Zentrum einer ringförmigen Fotozelle geworfen. Kommt eine Blutzellsuspension in den Strahlengang, so wird ein Teil des Lichts durch die Kugelzellen abgelenkt, trifft auf den Ring der Fotozelle und erzeugt einen Strom. Bei Nullabgleich mit einem entgegengesetzt fließenden Kompensationsstrom kann auf einer Skala direkt die Erythrozytenkonzentration/mm³ abgelesen werden. Die Breite der Ringzelle ist so gewählt, daß der Fotostrom innerhalb einer bestimmten Streubreite des Ablenk winkels, der durch die Teilchengröße gegeben ist, annähernd konstant bleibt. Fehler treten nur bei abnormer Teilchengröße auf.

2. Das Leitfähigkeitsmeßprinzip.

Die Entwicklung dieses Verfahrens war in erster Linie auf industrielle Fragestellungen hin erfolgt. Die Korngrößen von Zementstäuben, Tropfengrößen in Emulsionen, Abmessungen suspendierter Fasern sollten bestimmt und die Anzahl der Partikel in der Volumeneinheit gezählt werden. Bald stellte sich jedoch heraus, daß das gleiche Verfahren mit einigen Änderungen auch für die Zählung und Volumenbestimmung von Zellen geeignet war. Intakte Zellen haben infolge ihres hohen kapazitiven Membranwiderstandes die für dieses Verfahren entscheidende große Leitfähigkeitsdifferenz von mehreren Zehnerpotenzen gegenüber Plasma und den üblichen isotonischen Elektrolytlösungen.

Der amerikanische Ingenieur COULTER (4) beschritt mit der Anwendung dieses Meßverfahrens einen völlig neuen Weg. Das Prinzip seiner Meßanordnung ist einfach:

Die zu vermessenden Partikel werden in einer elektrisch leitenden Flüssigkeit aufgeschwemmt. In die Suspension taucht ein Glasrohr mit feiner zylinderförmiger Kapillarbohrung, deren

Dimensionen genau festgelegt sind. Das Verhältnis von Länge zu Durchmesser beträgt $7 : 10$, der Durchmesser selbst soll so bemessen sein, daß der Durchmesser der zu messenden Partikel zwischen 2 und 50 % des Lochdurchmessers liegt. Mithilfe eines Unterdrucks wird die Suspension in genau definierten Volumina durch die Kapillare gesaugt. Legt man zwischen zwei in die Suspension und den Innenraum des Glasrohres eingetauchte Platinelektroden eine Gleichspannung an, so bildet die einzig leitende Verbindung die Flüssigkeitsbrücke durch die Kapillaröffnung (Abb. 1). Der elektrische Widerstand des Systems und damit die je Zeiteinheit fließende Strommenge sind fast ausschließlich durch die Dimensionen der Kapillaröffnung bestimmt. Jede die Kapillaröffnung passierende Partikel von hohem elektrischen Widerstand verkleinert für die Zeit ihres Durchtritts das effektive Kapillarvolumen und führt gemäß dem Ohmschen Gesetz zu einer Widerstandserhöhung, die sich, sofern man die Stromstärke konstant hält, in einem momentanen Spannungsanstieg, einem Impuls, ausdrückt. Die Breite des Impulses entspricht der Durchtrittszeit, die Höhe ist dem Teilchenvolumen proportional, sofern das Teilchen gegenüber den Abmessungen des Lochs klein ist. Unter den für Zellen gegebenen Arbeitsbedingungen sind die erzielten Widerstandsänderungen und Spannungsimpulse sehr klein. Sie liegen im Bereich von wenigen Ohm, bzw. Millivolt, der Ruhewiderstand dagegen liegt zwischen 10 und 50 Kiloohm, entsprechend einer Spannung von 10 bis 50 Volt.

Die Impulse werden im Meßteil des Geräts verstärkt, gezählt und in ihrer Größe bewertet. Der Rücklauf eines Quecksilberfadens, der im Ruhezustand der Meßeinrichtung durch Unterdruck angesaugt ist, bewirkt nach Sogabschaltung eine gleichmäßige, weitgehend laminare Strömung für die Dauer des Meßvorganges, da der Druckausgleich nur über die Kapillaröffnung

erfolgen kann. Während des Rücklaufs schaltet der Quecksilberfaden beim Überstreichen zweier Kontakte den Zähler ein und aus. Der Abstand der Kontakte entspricht einer definierten Suspensionsmenge. Eine Umpolung des Elektrodenstroms von Messung zu Messung wirkt einer Elektrolyse der Salzlösung entgegen. Die dabei auftretende pH-Verschiebung würde zu einer Volumenänderung oder zu einer Zerstörung der Zellen in Elektrodennähe führen. Die Größenbewertung vollzieht ein Diskriminator, dessen Vorspannung mithilfe eines Potentiometers stufenlos verändert werden kann. Es werden jeweils nur diejenigen Impulse bewertet, die die vorgegebene Spannung überschreiten. Erhöht sich unter sonst gleichbleibenden Bedingungen in einer Reihe aufeinanderfolgender Zählungen laufend die Vorspannung in geeichten Stufen, so werden die kleineren Impulse immer mehr ausgeblendet, die registrierte Zellzahl nimmt ab und geht gegen Null. Die graphische Darstellung einer solchen Meßreihe ergibt eine Integralkurve, deren Differenzierung zur Volumenverteilungskurve der untersuchten Zellen führt (Abb. 2).

Schwierigkeiten in der Anwendung des Coulterschen Geräts.

Die grundsätzlichen Schwierigkeiten, bzw. Schwächen sind schon von mehreren Arbeitsgruppen erkannt und besprochen worden (16, 17, 18, 19). Sie wurden im Rahmen dieser Arbeit erneut bestätigt und sollen zum besseren Verständnis der eigenen Untersuchungen noch einmal kurz dargelegt werden.

Die erzielte Impulshöhe resultiert aus dem Proportionalitätsverhältnis zwischen dem Widerstandsvolumen der Partikel und dem effektiven Widerstandsvolumen der Kapillare.

Das effektive Widerstandsvolumen ist infolge der zunehmenden Bündelung der Feldlinien des elektrischen Feldes mit dem ungefähr dreifachen tatsächlichen Volumen einzusetzen (20).

Liegen die erzielten Impulse außerhalb des Meßbereichs, sei es, daß sie für den Diskriminator zu groß oder zu klein sind, oder daß sie bereits so klein sind, daß sie im elektronischen Rauschen verschwinden, so kann ihre Größe auf verschiedene Weise verändert werden:

a) Durch Wählen einer anderen Kapillaröffnung kann die Impulshöhe in den gewünschten Bereich gebracht werden; denn je größer der Durchmesser der Öffnung gewählt wird, desto kleiner sind die Impulse und umgekehrt. b) Eine Änderung der Verstärkung kann dem gleichen Ziel dienen. c) Wird die Leitfähigkeit der Elektrolytlösung verändert, so wird die Höhe der Impulse mitbeeinflusst. d) Eine höhere oder niedrigere Elektrodenspannung bewirkt größere oder kleinere Impulse.

Mit der Aufzählung dieser Möglichkeiten sind auch die Schwierigkeiten aufgezeigt, die sich für die Untersuchung lebender Zellen ergeben. Die Impulse sind klein, die Verwendung sehr enger Kapillaren setzt, um deren Verschluß vorzubeugen, äußerste Reinheit der Suspensionslösung voraus. Bei der Vermessung von Blutzellen sind auch dann noch Störungen von seiten kleinster Fibringerinsel zu erwarten. Größere Verstärkung bringt bei der Kleinheit der Originalimpulse eine Mitanehebung des Rauschens im Verstärker, so daß kein wesentlicher Gewinn für die Volumendiskriminierung zu erwarten ist. Eine Änderung der Leitfähigkeit ist bei lebenden Zellen infolge der eintretenden Volumenänderung durch Osmose nicht möglich. Will man umgekehrt osmotische Untersuchungen, z.B. die Bestimmung des Hämolysevolumens

durchführen, muß durch laufende rechnerische Korrekturen die geringere Leitfähigkeit hypotoner Lösungen mit berücksichtigt werden. Auch eine osmotisch inerte Partikel erscheint in Lösungen niedriger elektrischer Leitfähigkeit größer. Eine Erhöhung der angelegten Spannung bzw. des Stromes geht bei intakten Zellen auf Kosten der Membranerhaltung. Bereits ein Gleichstrom von einem Milliampere führt nach etwa 20 Minuten zu einer deutlichen Volumenänderung der Zellen (19).

Ein anderes Problem bei der Vermessung biologischer Materialien ist die mit zunehmender Stromstärke steigende Elektrolyse der Salzlösungen, die von den Elektroden ausgehend allmählich die ganze Suspension durch eine pH-Verschiebung beeinträchtigt: für inerte Partikel unbedeutend sind auch geringe pH-Verschiebungen für Zellen, selbst innerhalb des physiologischen pH-Bereichs, schon von Bedeutung und können bei Blutzellen erhebliche Volumenverfälschungen zur Folge haben. COULTER läßt deshalb sein Gerät nach jedem Meßvorgang automatisch umpolen. Da jedoch der Elektrodenstrom sofort wieder fließt, wenn das Zählwerk gelöscht ist, bis zur nächsten Messung aber noch mehrere Handgriffe nötig sind, verlängert sich die mit 15 Sekunden relativ lange Zählzeit für den Stromfluß auf das mindestens Doppelte.

Mit der laufenden Umpolung muß noch eine weitere Fehlerquelle in Kauf genommen werden, der sogenannte Umpolfehler: In dem Maße, in dem man sich bei der Diskriminierung dem abfallenden Schenkel der Zählkurve nähert, beginnen die mit positiver und negativer Spannung gewonnenen Zählergebnisse immer weiter voneinander abzuweichen. Die Abweichungen können zwischen 3 und 30 % liegen, die Reproduzierbarkeit in der gleichen Zählrichtung ist dabei gleichbleibend gut. COULTER berücksichtigt diesen Punkt bereits in seiner Bedienungsanleitung und empfiehlt jeweils den Mittelwert zwischen zwei

Zählungen zu nehmen, der den wahren Ergebnissen entspreche. Er erklärt diesen Befund mit einem nicht eliminierbaren Rückkopplungsfehler des Verstärkers. Sehr störend ist, daß dadurch in jedem Fall Doppelzählungen vorgenommen werden müssen, obgleich die Reproduzierbarkeit der Elektronik ein solches Vorgehen erübrigen würde. Überdies sollten gerade bei Zellen infolge der erwähnten raschen Zersetzung der Lösung möglichst schnell die Verteilungskurven gewonnen werden. Trägt man nach der Differenzierung die Punkte der positiven und negativen Seite getrennt graphisch auf, so entstehen Verteilungskurven mit relativ deckungsgleichem Anstieg und immer weiter voneinander abweichendem rechts-schiefen Abfall.

Die Volumenverteilungskurven, die mit dem Coulterschen Gerät gemessen werden, zeigen regelmäßig eine Rechtsschiefe. Dieses Phänomen ist nicht Überraschend, da der gleiche Befund für zahlreiche andere biologische Parameter ebenfalls erhoben werden kann. Beeinträchtigt wird die Gültigkeit des Befundes jedoch durch die sogenannte "Koinzidenz", ein dem Coulterschen Konstruktionsprinzip anhaftender grundsätzlicher Zählfehler. Unter Koinzidenz versteht man das gleichzeitige Auftauchen mehrerer Partikel im kritischen Kapillarvolumen, wobei je nach dem Abstand der Partikel voneinander jede Impulsform, von einem normal hohen aber doppelt breiten, bis zu einem normal breiten aber doppelt hohen Impuls entstehen kann (Abb.3). Die Koinzidenz bewirkt weiter, daß mit zunehmender Suspensionskonzentration relativ immer weniger Zellen gezählt werden. Als Korrekturkurven gibt COULTEP Funktionen zweiter Ordnung an, in die Konzentration und Kapillargröße eingehen. Niedrige Konzentration und kleiner Kapillardurchmesser verringern die Koinzidenz.

Wie Versuche mit Latexkugeln mit einer sehr geringen Volumestreueung gezeigt haben, bewirkt die Koinzidenz das Auftreten

eines zweiten und weiterer Gipfel beim doppelten und mehrfachen Partikelvolumen. Es sind aber nicht nur Einfach-, Doppelt-, und Mehrfachdurchtritte möglich, sondern auch infolge des unterschiedlichen Partikelabstandes $1 + \frac{1}{n}$ tel Durchtritte, die ebenfalls in der Volumenverteilungskurve ihren Niederschlag finden müssen; n kann hier theoretisch jeden Wert zwischen ∞ und 1 annehmen.

Die rechtsschiefe Verteilung menschlicher Erythrozyten könnte auf diese Weise zustande kommen; gelegentlich findet sich jedoch ein weiterer Gipfel oder eine Schulter beim doppelten Zellvolumen. Statistisch war dieser Befund nicht zu erklären, da eine einfache rechtsschiefe Verteilung von 1 über $\frac{1}{n}$ nach n , ohne weitere deutlich erkennbare Gipfel bei dem n -fachen des Einzelmaximums zu erwarten war. Die Korrekturkurven COULTERS sind für glatte Doppeldurchtritte berechnet.

Entwicklung eines neuen Geräts.

Infolge der an dem Coulterschen Gerät aufgetauchten Störungen und Fehler sollte der Versuch gemacht werden, unter Bewahrung des Coulterschen Grundgedankens ein Gerät zu entwickeln, das diese Schwächen nach Möglichkeit eliminiert und in erster Linie zur Zellvolumenbestimmung geeignet ist.

Die elektronischen Versuchsaufbauten und das neue Gerät baute cand. Ing. Jürgen Gutmann als Diplomarbeit der Technischen Hochschule München (Institut für Nachrichtentechnik, Direktor: Prof. Dr. H. Piloty) in den Elektronikwerkstätten des Max-Planck-Instituts für Physik und Astrophysik und des Max-Planck-Instituts für Biochemie (München).

Die Änderungen an dem neuen Gerät lassen sich in zwei Gruppen einteilen: erstens solche, die der Verbesserung der Meßgenauigkeit dienen und zweitens solche, die die Bedienung erleichtern und damit die Meßgeschwindigkeit erhöhen und den subjektiven

Meßfehler verringern.

Im einzelnen wurden von Gutmann folgende Punkte abgeändert:

- 1) An die Stelle einer stabilisierten Elektrodenspannung tritt ein geregelter Strom, so daß sich Widerstandsänderungen im System infolge Leitfähigkeitsänderungen der Lösung in der Impulshöhe weniger bemerkbar machen. Ein Instrument zeigt zu jedem Zeitpunkt des Meßvorganges wahlweise Stromstärke, Spannung, Widerstand und Stromrichtung an. Die Umpolung erfolgt weiterhin nach jeder Messung, jedoch automatisch, die Spannung wird jedoch erst mit Meßbeginn angelegt, so daß in den Meßpausen kein Strom durch die Suspension fließt.
- 2) Der einfache Diskriminator, der mit einer Umdrehung von etwa 320 Grad den Meßbereich in 100 Stufen zerlegt, wird durch einen Diskriminator (System Helipot) mit zehnfachem Wendelpotentiometer ersetzt, der den Meßbereich mit 10 Umdrehungen in 1000 Einheiten teilt und somit eine wesentlich genauere Einstellung ermöglicht. Als Doppeldiskriminator mit variablem Spalt geschaltet, bildet er ein elektronisches Fenster. Er bewertet jeweils nur diejenigen Impulse, deren Scheitel innerhalb der eingestellten 0,5 bis 10,0 % des Gesamtmeßbereichs liegen. Wird das Fenster von Messung zu Messung um eine Fensterbreite verschoben, läßt sich direkt, unter Umgehung der Integralfunktion, die Volumenverteilung der Zellsuspension ermitteln. Die Klassengrenzen entsprechen dabei jeweils einer Fensterbreite. Das gleiche Prinzip wurde während unserer Entwicklungsarbeiten auch von COULTER bei einem neuen Gerät, Modell B, angewandt, das den zusätzlichen Anschluß eines Nachlaufschreibers ermöglicht. Der Diskriminator durchläuft bei diesem Gerät in 25 Schritten automatisch seinen ganzen Bereich. Eine solche Automatik wurde bei unserem Gerät ebenfalls vorgesehen.
- 3) Das Coultersche Modell A arbeitet auf Volumenbasis, das heißt der Zähler wird nach Durchlauf eines bestimmten Suspen-

sionsvolumens abgeschaltet. Da ein automatisch gesteuerter Diskriminator günstiger mit einem kontinuierlichen Suspensionsdurchlauf und Zählung in exakten Zeitintervallen zu betreiben ist, können sowohl bei unserem neuen Gerät, als auch bei dem Coulterschen Modell B Zählungen auf Zeitbasis vorgenommen werden. Darüberhinaus ist bei unserem Gerät eine zusätzliche Zählweise auf Prozentbasis möglich. Diese Zählweise wird mit zwei gleichzeitig laufenden Zählern bewerkstelligt, deren einer sämtliche, die Kapillare passierenden Partikel registriert und nach Erreichung einer vorgegebenen Zahl 1000 oder 10 000 stehenbleibt und den zweiten Zähler mitanhält. Da dieser mit Hilfe des elektronischen Fensters nur eine ganz bestimmte Partikelgröße erfaßt, kann auf dem zweiten Zählwerk direkt deren prozentualer Anteil an der Gesamtpopulation abgelesen werden.

4) Da das Gerät hauptsächlich zur Volumenbestimmung von Einzelzellen und weniger zur Konzentrationsbestimmung von Zellsuspensionen angewandt werden sollte, wurde eine andere Art der Impulsverarbeitung gewählt, die verfälschte Impulse weitgehend unterdrückt.

5) Die Zeitschaltungen des Geräts werden von einer eingebauten Quarzuhr vorgenommen. Ein eingebauter Impulsgenerator ermöglicht die laufende Nacheichung von Verstärker und Diskriminatoren, da die Eichimpulse weitgehend die Form der Originalimpulse nachahmen.

6) Das gesamte Gerät wurde in Einschubbauweise erstellt, so daß jederzeit Bausteine ausgewechselt werden können. Der normalerweise verwendete Diskriminatoreinschub mit linearen Klassengrenzen kann z.B. gegen einen solchen mit logarithmischen Klassengrenzen ausgetauscht werden. Ein Baustein hat die Funktion eines "Kommandowerks" das nach Eingabe die einzelnen Programme vollautomatisch durchsteuert, somit Zählpausen vermindert und manuelle Schaltfehler ausschließt.

Eine Anzahl geplanter Verbesserungen konnte bis jetzt noch nicht durchgeführt werden. Dazu gehören vor allem der Anschluß eines Tonbandgeräts, das die Impulsfolgen, vor allem bei rasch verlaufenden Volumenänderungen undiskriminiert speichern soll. Die Ermittlung der Größenverteilung kann anschließend bei der Wiedergabe über das Gerät erfolgen. Die Verwendung eines Nachleuchtschirms, zusammen mit einer starken Dehnung der Zeitachse des Oszillographen, soll der Sichtbarmachung der Einzelimpulse und deren Konservierung für einige Sekunden dienen (Abb.4).

Untersuchungen mit dem Coulterschen Gerät Modell A.

1. Verwendung unpolarisierbarer Kupfersulfatelektroden.

Wie bereits erörtert, traten bei dem Coulterschen Gerät Zählerdifferenzen in Abhängigkeit von der Polung des Elektrodenstroms auf. Das höhere Zählergebnis fand sich dabei immer bei negativer Spannung der Außenelektrode. Um den Zeitverlust durch die, für ein verlässliches Ergebnis erforderlichen Doppelbestimmungen zu begegnen, wurden unpolarisierbare Kupfersulfatelektroden entwickelt (21). Diese Elektroden machten Umbauten am mechanischen Teil der Coulterschen Apparatur erforderlich.

Die Kupfersulfatelektroden verringerten die Zählerdifferenzen in beiden Stromrichtungen nur unwesentlich, erlaubten jedoch die Verwendung nur einer Polarisationsrichtung. Sie zeigten eine Reihe von Nachteilen, die schließlich den Abbruch dieser Versuche zur Folge hatten.

Als **bedeutendste** Fehlerquelle erwies sich die Antennenwirkung der Kupfersulfatelektroden. Störimpulse aus dem Raum, wie z.B. Schaltungen eines Kühl- oder Brutschrankrelais, Anfahren eines Aufzugs, der Lauf einer Zentrifuge und Schaltimpulse im Gerät selbst ergaben Störimpulse unterschiedlicher Höhe, die mit in das Zähl- und Diskriminationsergebnis eingingen. Eine Abschirmung der Elektroden mit einem Kupferdrahtnetz, auch das Verbringen des gesamten mechanischen Teils in einer Faradayschen Käfig brachte nur wenig Abhilfe.

Die Kupfersulfatelektroden verbrauchten sich unter den gegebenen Bedingungen rasch. Nach etwa 10 - 15 Meßstunden wurde eine Erneuerung erforderlich, die jeweils einen ganzen Arbeitstag in Anspruch nahm.

2. Weiterführung der Koinzidenzversuche.

Mit zunehmender Zellkonzentration wird die Wahrscheinlichkeit immer geringer, daß eine Zelle allein die Kapillare passieren kann. Zudem ist die Wegstrecke, auf der sich das Auftauchen der Zelle als Widerstandsänderung bemerkbar macht, entsprechend der Ausdehnung des elektrischen Feldes, wesentlich länger, als die eigentliche Länge des Kapillarloches. Zellen müssen sich also auch bei einigem Abstand voneinander bereits als mehr oder minder verformte oder vergrößerte Impulse bemerkbar machen. (Abb. 3).

Wie bereits dargestellt, stimmen die von Coulter angegebenen Korrekturkurven für die Zählung gut mit den von uns gefundenen Werten überein. Dies dürfte aber nicht der Fall sein, sollten nicht nur zusammenhängende, sondern auch eng benachbarte Zellen einander beeinflussen, da auch diese einen einzigen gemeinsamen, wenn auch atypischen Impuls zur Folge haben müßten.

Während dieser Messungen bestand noch keine Möglichkeit, Einzelimpulse sichtbar zu machen und zu messen, deshalb wurden Verdünnungsreihen gleichen Blutes hergestellt, diesmal wurde das Hauptaugenmerk auf die Form der erzielten Verteilungskurven gelegt. Zwar konnte Coulter durch einen elektronischen Kunstgriff Mehrfachimpulse in ihre Komponenten zerlegt haben, für die Diskriminierung war aber zu erwarten, daß der Größenbewertung der Scheitel des Gesamtimpulses zugrunde lag.

Versuch: Bei allen Versuchen mit dem Coulterschen Gerät wurde 0,9 %ige Kochsalzlösung unter Zusatz von 10 % Sörensenpuffer (22) von pH 7,3 verwendet. Kapillarblut wird mit gepufferter physiologischer Kochsalzlösung versetzt, auf eine Konzentration von 100 000 Erythrozyten/0,5 ml verdünnt, durch laufende Verdünnungsschritte um den Faktor 2 eine

Reihe hergestellt und vermessen.
Schaltung: Verstärkerstufe 6, Diskriminatorinter-
valle 4 Einheiten.
Es wurden 10 solcher Reihen durchgemessen.

Ergebnis: Nach Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors und der Koinzidenzkorrektur lag der mittlere Zählfehler bei $\pm 1\%$, und damit nur etwa doppelt so hoch, wie der Zählfehler bei mehrmaliger Konzentrationsbestimmung der gleichen Suspension. Die graphische Darstellung der Verteilungskurven ergab mit zunehmender Konzentration eine Verschiebung des Maximums nach rechts, also in Richtung eines größeren mittleren Zellvolumens, ein zweiter flacher Gipfel trat bei dem annähernd doppelten Zellvolumen auf. Das statistische Mittel lag nicht mehr bei dem Volumen einer Einzelzelle, sondern bei dem Volumen einer Zelle vermehrt um den Bruchteil des Volumens einer zweiten Zelle. Gleichzeitig war eine zunehmende Rechtsschiefe der Verteilung zu verzeichnen. Dies war zu erwarten, da sich das Zusammenrücken der Zellen in einer Häufung überhöhter Impulse bemerkbar macht. Unerklärlich blieb das Auftreten eines deutlichen zweiten Verteilungsmaximums beim doppelten Einzelzellvolumen, dieses hätte lediglich einen Punkt im Verlauf der flach abfallenden Flanke bilden dürfen. Das Phänomen könnte darauf beruhen, daß mit zunehmender Zellkonzentration in der Suspension, das völlige Zusammentreten von Zellen, und damit exakt doppelt hoher Impulse, als es der statistischen Wahrscheinlichkeit entspricht.

Mit kleinen Latexpartikeln geringer Streuung, Durchmesser $2,79 \pm 0,05 \mu$, können ebenfalls mehrere scharf gegeneinander abgegrenzte Maxima erzielt werden.

3. Aufstellung einer Normalverteilungskurve menschlicher Erythrozyten.

Aus obigem Versuch ergab sich weiter, daß eine Konzentration

von 20 000 Erythrozyten/Messvolumen die obere Grenze ist, bis zu der mit einer einigermaßen genauen Ermittlung des Verteilungsmaximums des Erythrozytenvolumens zu rechnen ist. Zur Klärung der Variabilität menschlicher Erythrozytenvolumina wurden 84 Blutproben gesunder Spender, teils als Venenblut, teils als Kapillarblut untersucht.

Versuch: a) Kapillarblut: Einstich mit einem Hämостilet in die mit Alkohol gereinigte Fingerbeere und Abtropfenlassen des Blutes in ein Becherglas mit gepufferter physiologischer Kochsalzlösung. Bestimmung der Zellkonzentration mit einer Gesamtzählung bei Diskriminatorstellung 20, Verstärkerstufe 6, und Einstellung mit weiterer gepufferter Kochsalzlösung auf eine Endverdünnung von 20 000 Erythrozyten/Messvolumen.

b) Venenblut: Einfließenlassen des Blutes aus einer in die Kubitalvene eingeführten Kanüle in ein Zentrifugenröhrchen bis zu einer Markierung von 5,0 ml. Vorgabe von 0,5 ml einer Heparinlösung ("Vetren" Promonta 100 I.E./ml) garantiert eine Gerinnungshemmung über mindestens 24 Stunden.

Gründliche Vermischung des Blutes mit dem Vetren und Überführen eines Tropfens mit Hilfe einer Glasöse in ein Becherglas mit gepufferter physiologischer Kochsalzlösung. Weitere Behandlung wie oben.

Aufnahme der Integralkurve der Erythrozytensuspension mit den Klassengrenzen von 2 Diskriminatoreinheiten bis zum Abfall des Zählwerts auf 10 % der Gesamtzellkonzentration.

Ergebnis: Die resultierenden Verteilungskurven waren in über 90 % der Fälle mehrgipfelig. Ein Hauptgipfel lag bei dem schon früher ermittelten Wert von $84 \mu^3$, ein zweites Maximum geringerer Höhe mit großer Konstanz bei $92,5 \mu^3$. Den mittleren Blendenwerten von 42,6 und 46,5 entsprechen Volumina von $84,6 \mu^3$ und $92,5 \mu^3$. Die Stellen hinter dem Komma sind rechnerisch ermittelt, die Ablesegenauigkeit beträgt eine Blendeneinheit, dies entspricht $2 \mu^3$.

Ein signifikanter Unterschied zwischen Venenblut und Kapillarblut - ohne Vetrenzusatz - ließ sich nicht ermitteln. Bei einem Teil der Blute traten weitere Volumensmaxima geringer Höhe und unterschiedlicher Lage bei höheren Blendenwerten auf. Die Lage der Gipfel war bei den einzelnen Populationen gelegentlich reproduzierbar.

Mit diesem Befund wurden die allein auf dem Coulter-schen Gerät basierenden Untersuchungen abgeschlossen.

Physikalische Untersuchungen mit Versuchsaufbauten zu einem neuen Gerät.

1. Bestimmung der Kapillardimensionen.

Die Durchmesser der zu dem Coulter-schen Gerät erhältlichen Kapillaren sind bekannt. Für den Impulsablauf sind jedoch die Kapillarlängen von mindestens ebenso großer Bedeutung. Laut Herstellerangabe handelt es sich um exakt zylinderförmige Bohrungen.

Versuch: Die uns zur Verfügung stehenden Kapillaren der Durchmesser 30, 50, 70, 100, 140, 200, 300 und 350 μ werden im Winkel von 45 Grad unter ein Mikroskop mit großem Arbeitsabstand gebracht und die dabei sichtbare Länge der Bohrung in dem eingeschlossenen Quarzplättchen gemessen. Umrechnung der durch die Neigung entstandenen Verkürzung auf die wirkliche Länge.

Ergebnis: Die Bohrungen sind außerordentlich glattwandig, von dieser Seite ist keine Turbulenz der Strömung zu erwarten. Für jede der vermessenen Kapillaren beträgt die Länge 70 % des mit ± 1 % Genauigkeit angegebenen und nachgemessenen Durchmesser. Ein konstantes Verhältnis der beiden Größen zueinander war zu fordern, nachdem Coulter angibt, daß bei Halbierung des Kapillardurchmessers die Impulshöhe verdoppelt werde. Bei Halbierung des Querschnitts der Kapillaröffnung beträgt die Fläche der Öffnung nur noch

ein Viertel. Da die Größe eines Widerstandes, gleichgültig ob es sich um eine Flüssigkeitsbrücke oder um einen Draht handelt, durch den Querschnitt mal der Länge bestimmt ist, darf eine Kapillare halben Durchmessers auch nur die halbe Länge haben um den doppelten Widerstand und damit die doppelte Impulshöhe zu erzielen. Für Kapillaren der Durchmesser 35:50:70:100:140:200 μ gelten demnach annähernd folgende Widerstandsverhältnisse: 6:4:3:2:1,5:1.

Nachdem auf diese Weise die Fehlerbreite der Umrechnung der Impulshöhe für die einzelnen Kapillaren festgelegt war sollten als nächster Vorversuch zur Berechnung der Einzelimpulse die Strömungsgeschwindigkeit durch die Kapillare und die damit gegebenen Durchtrittszeiten der Zellen ermittelt werden.

2. Bestimmung der Strömungsgeschwindigkeit und der Durchtrittszeit der Zellen.

Zum Zeitpunkt dieser Untersuchung stand noch keine gekoppelte elektronische Uhr zur Verfügung, die Versuchsanordnung war deshalb hinsichtlich der Zeitmessung relativ einfach. Das Ergebnis ist, da der gleichbleibende subjektive Zeitfehler sich statistisch ausmittelt, trotzdem zu verwerten.

Versuch: Herstellung einer Suspension mit einer Konzentration von 50 000 Erythrozyten/0,5 ml. Unter Verwendung der bei dem Coulter-Modell A gebräuchlichen Zählweise auf Volumenbasis wird eine Reihe von 100 aufeinanderfolgenden Gesamtzählungen bei Diskriminatorstellung 20 vorgenommen. Die Zeit zwischen Anlaufen und Stoppen des Zählwerks - elektronische Dekaden - wird mit Hilfe einer Stoppuhr festgehalten. Die hohe Suspensionskonzentration garantiert eine genaue Registrierung der Laufzeit. Zählungen, bei denen eine kurzfristige Verstopfung oder Einengung der

Kapillare infolge der hohen Zellkonzentration eintrat, akustisch an einer Änderung im Rhythmus des mechanischen Tausender-Zählwerks erkennbar, wurden nicht berücksichtigt. Gemessen wurde mit einer 100 μ Kapillare.

Ergebnis: Mittlere Meßzeit $14,8 \pm 0,3$ sec., die Schwankungsbreite lag also unter 5 %.

Mit Hilfe dieses Wertes läßt sich die Strömungsgeschwindigkeit berechnen. Eine 100 μ Kapillare hat einen Querschnitt von $7,85 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$. Aus einem Durchfluß von 0,5 ml/15 sec. ergibt sich ein Sekundendurchfluß von $33,3 \text{ mm}^3$. Die Durchflußgeschwindigkeit beläuft sich demnach auf:

$$\frac{33,33 \text{ mm}^3}{7,85 \times 10^{-3} \text{ mm}^2 \times \text{sec.}} = 4245 \text{ mm/sec.}$$

Dies entspricht einer Geschwindigkeit von über 15 Stundenkilometern.

Aus der gefundenen Strömungsgeschwindigkeit von 4245 mm/sec. und der Kapillarlänge von 0,07 mm läßt sich die Durchtrittszeit einer Zelle errechnen:

$$\frac{0,07 \text{ mm}}{4245 \text{ mm} \times \text{sec}^{-1}} = 16,4 \times 10^{-6} \text{ sec.}$$

Die eigentliche Impulsdauer, also die Verweildauer einer Zelle in der Öffnung einer 100 μ Kapillare liegt bei etwa 16,4 Mikrosekunden.

3. Darstellung von Einzelimpulsen und Impulsfolgen.^{+))}

Aufschluß über die tatsächliche Impulslänge und Impulsform gab die Darstellung von Originalimpulsen und Impulsfolgen wie sie bei der Kapillarpassage entstehen.

^{+))}

Dieser Versuch wurde von der Arbeitsgruppe gemeinsam durchgeführt.

Dazu mußten die Impulse vor dem Verstärker des Coulter-schen Geräts abgefangen und unverfälscht vergrößert wiedergegeben werden.

Versuch: Das Steuerkabel des mechanischen Teils eines Coulter-Geräts Modell A wird mit dem Eingang eines Tektronix-Breitbandoszillografen verbunden. Die einlaufenden Originalimpulse werden über einen Millivolteinschub verstärkt und auf dem Bildschirm wiedergegeben. Das Gerät wird in einer Weise getriggert, daß ein zufällig ankommender Impuls bestimmter Höhe ein einmaliges Durchlaufen des Kathodenstrahls zur Folge hat. Auf den Bildschirm wird eine Polaroid-Land-Kamera gesetzt, mit der in Abständen von einer Minute Aufnahmen gemacht werden. Auf eine Triggerschaltung mußte zurückgegriffen werden um ein stehendes Bild aufnehmen zu können, da die statistisch erfolgenden und damit nicht synchronisierbaren Originalimpulse zu einer gegenseitigen Überlagerung geführt hätten.

Die Suspension wurde in mehreren Verdünnungen hergestellt und in kontinuierlichem Fluß durch die Kapillare gesaugt. Bei diesem Versuch hätten Strömungsunterbrechungen gestört, auf exakte Volumensmessung konnte verzichtet werden. Verwendet wurde eine $100\ \mu$ Kapillare. Der angelegte Strom betrug genau geregelt 1 mA. Nach jeder Aufnahme wurden die Elektroden umgepolt. Als Suspensionsflüssigkeit diente gepufferte physiologische Kochsalzlösung.

Ergebnis: Die Impulse sind glockenförmig mit geringer Rechtsschiefe. Die mittlere Impulsbreite liegt bei $50\ \mu\text{sec}$, die größte Breite bei $100\ \mu\text{sec}$, die schnellste Antriebszeit bei etwa $15\ \mu\text{sec}$. Die Höhe von menschlichen Erythrozyten liegt unter den Meßbedingungen im Mittel bei 1 - $1,5\ \text{mV}$. (Abb. 5)

4. Widerstandsmessung am Kapillarsystem.

Beim Coulterschen Gerät wird der Meßstrom von einer stabilisierten Gleichspannungsquelle von 300 Volt über einen entsprechenden Vorwiderstand geliefert. Dieser

Vorwiderstand kann in Stufen um den Faktor 2 vergrößert oder verkleinert und damit die Elektrodenspannung um den gleichen Faktor geändert werden. Der Verstärkungsfaktor der Elektronik bleibt konstant. Er läßt sich nur durch einen im Inneren des Geräts befindlichen Schalter ändern. Die Impulshöhe ist eine Funktion des zwischen den Elektroden fließenden Stroms.

Da die Stromstärke nicht geregelt ist, sondern lediglich eine Spannungsstabilisierung vorgenommen wird, können bereits geringfügige Änderungen der Elektrolytleitfähigkeit durch Temperatur- oder Salzkonzentrationsschwankungen, oder eine beginnende Elektrolyse vor den Elektroden Stromschwankungen auslösen. Damit wird auch die Impulshöhe verfälscht.

Um die auftretenden Polarisationsspannungen und den Regelbereich zu erfassen, wurde ein unabhängig von Zählgerät und Elektronik arbeitender Versuchsaufbau zusammengestellt, mit dessen Hilfe Spannung und Stromstärke beliebig verändert werden konnten.

Versuch: Eine als Versuchsaufbau hergestellte geregelte Stromquelle wird mit dem mechanischen Teil des Coulterschen Geräts verbunden. Die Stromquelle vermag geregelte Ströme im Bereich von 0,1 - 3,0 mA abzugeben. An die Elektrodenklemmen ist ein Siemens-Multizet-Universalmeßinstrument angeschlossen, das im benutzten Meßbereich von 1,5 M je nach Schaltung eine präzise Ablösung der anfallenden Spannungen und somit der Widerstände erlaubt. Für die Messungen werden 100 μ Kapillare und die Original-Platinelektroden verwandt. Wie beim normalen Betrieb wird die positive bzw. negative Spannung an die große Innenelektrode gelegt und die kleinere in den Meßbecher tauchende Elektrode geerdet.

Als Elektrolytlösungen dienen ungepufferte physio-

logische Kochsalzlösungen. Meßtemperatur 23 Grad.

Ergebnis: Beim Einschalten oder Umpolen steigt die Spannung relativ rasch an, um dann einem Endwert zuzustreben. Bei strömender Elektrolytlösung erfolgt der Anstieg rascher.

Durch die an den Elektroden auftretende gegensinnige Polarisationsspannung kann der Spannungsendwert nicht noch schneller erreicht werden.

Bei Verwendung einer 100 μ Kapillare liegt die erzeugte Spannung zwischen 10 und 50 Volt, der Widerstand zwischen 10 und 50 Kiloohm.

Biologische Untersuchungen mit dem neuen Gerät.

Nach Festlegung der physikalischen Konstanten und Charakteristiken des Coulterschen Meßprinzips und deren Auswirkung in den beiden darauf basierenden Geräten wurde eine Reihe biologischer Versuche durchgeführt, die das Verhalten von Erythrozyten bei der Messung und bei den für die Messung erforderlichen Präparationsvorgängen betreffen. Im weiteren wurde die Anwendbarkeit des Gerätes auch für anders geformte Zellen untersucht.

Bei allen Versuchen mit dem neuen Gerät wurde eine 0,95 %ige Kochsalzlösung aus täglich frisch destilliertem Wasser unter Zusatz von 10 % Michaelis-Puffer (23) mit einem pH von 7,25, verwandt. Alle Glaswaren wurden sorgfältig gereinigt und bis zur Verwendung in einem staubfreien Brutschrank aufbewahrt. Eine Kontrolle dieser Maßnahmen bildete die Leerzählung der Elektrolytlösung die 10 Partikel/sec. bei unterster Diskriminatorstellung nicht überschreiten durfte. Die Suspension wurde auf eine Konzentration von 600 - 1000 Partikel/sec. eingestellt. Zur Gerinnungshemmung wurde den Blutproben eine

Heparinlösung im Verhältnis 1:10 zugegeben. ("Vetren"
Promonta 100 I.E./ml)

Meßdaten: Eingangsimpulse (100 μ Kap.)	ca. 1 mV
Diskriminatorgesamtbereich	1,5 - 15 V
Verstärkungsbereich	125 - 125 000
Verstärkungsstufen	1,2,5,10,20,50,...1000
Fensterbreiten in % des Diskriminator- gesamtbereichs	0,5 - 10,0 %
Kapillardurchmesser	100,70,50,30 μ
Sauggeschwindigkeit	0,5 ml/15 sec
Temperatur	23 Grad

1. Gipfelvolumen einer Erythrozytenpopulation vor und nach Kapillarpassage.

Als erste Frage sollte geklärt werden, ob die Zellen beim Durchlaufen des Kapillarloches meßbare Veränderungen erfahren. Um dies zu prüfen, wurden Erythrozyten, die die Kapillare bereits passiert hatten, erneut vermessen.

Versuch: Von menschlichen Erythrozyten wird unter Verwendung einer 100 μ Kapillare unter Standardbedingungen eine Volumenverteilungskurve aufgenommen. Anschließend wird das mittlerweile mit der Suspension angefüllte Kapillarrohr vorsichtig abgenommen und in ein trocknes Becherglas entleert. Die so wiedergewonnene Suspension wird nochmals vermessen. Für die erste Verteilungskurve war eine Meßzeit von im Mittel 10 Minuten erforderlich. Die Konzentration der Suspension bei Wiedervermessung lag infolge Verdünnung in der bereits vor Meßbeginn mit Kochsalzlösung gefüllten Kapillare bei etwa 65 % der Ausgangskonzentration. Es wurden 5 Blute auf diese Weise vermessen.

Ergebnis: Die Form der Volumensverteilungskurven war vor und nach der Passage gleich, die Gipfel lagen an der gleichen Stelle. Eine bleibende Änderung der Erythrozyten bei der Passage kann also ausgeschlossen werden. (Abb. 6)

2. Zusammenhang zwischen Gipfelvolumen und Aufbewahrungs- zeit einer Erythrozytenpopulation.

Es sollte untersucht werden, ob sich das Gipfelvolumen menschlicher Erythrozyten in Abhängigkeit von der Zeit-

spanne zwischen Blutentnahme und Vermessung ändert.

Versuch: Eine Flügelkanüle wird in die gestaute Kubitalvene eingeführt und das austretende Blut bis zur Markierung 5,0 ml in ein mit 1 ml Heparinlösung beschicktes Röhrchen einfließen gelassen. Das Röhrchen wird mit einem Gummistopfen verschlossen und das Blut durch mehrfaches Kippen sorgfältig durchmischt. Das Blut ist durch das im Überschuß zugegebene Heparin für mehrere Tage ungerinnbar gemacht. Zur Vermessung der Volumensverteilungskurve wird nach einer Stunde, sowie nach 12, 24, 48 und 72 Stunden jeweils mit einem Glasstab ein Tropfen Blut entnommen und in die gepufferte physiologische Kochsalzlösung überführt. Das Blut selbst wird in den Zwischenzeiten bei 4 Grad aufbewahrt.

Ergebnis: In der angegebenen Weise wurden 100 Blutproben gesunder Spender der Münchner Blutbank untersucht. Der Hauptgipfel der Volumensverteilungskurven blieb während 12 Stunden in allen Versuchen an der gleichen Stelle. Nach 24 Stunden war bei 10 % der Blute eine Vergrößerung des Gipfelvolumens um 7,5 % eingetreten. Nach 48 Stunden war bei etwa 30 % der Blute, nach 72 Stunden bei etwa 90 % eine Vergrößerung des Gipfelvolumens um 7,5 bis 15 % zu verzeichnen. Die Kurvenform wurde im allgemeinen etwas flacher, die Streuung der Volumina der Erythrozytenpopulationen nahm zu. Obwohl die Zellen in ihrem natürlichen Milieu, bei einer den Stoffwechsel stark reduzierenden Temperatur aufbewahrt wurden, unterlagen sie im Lauf von 1 - 2 Tagen einer Verschiebung des Gipfelvolumens. (Abb. 7)

3. Zusammenhang zwischen Aufschwemmungsdauer in physiologischer Kochsalzlösung und Gipfelvolumen einer Erythrozytenpopulation.

Aufgrund des vorhergegangenen Versuchsergebnisses war zu prüfen, wie sich das Erythrozytenvolumen verhält, wenn die Zellen für längere Zeit in einer physiologischen ge-

pufferten Kochsalzlösung aufgeschwemmt bleiben.

Versuch: Die Erythrozyten 15 verschiedener Blute werden wie üblich aufgeschwemmt und bei Zimmertemperatur 5 Stunden in der Lösung gelassen. In der ersten Stunde wurden alle 10 Minuten, danach bis zum Ablauf von 5 Stunden alle 30 Minuten Volumensverteilungskurven aufgenommen.

Ergebnis: Von den untersuchten 15 Bluten stieg das Gipfelvolumen in 4 Fällen innerhalb der ersten Stunde bis zu 15 % über den Ausgangswert an; danach erfolgte im Versuchszeitraum keine weitere Volumenzunahme. War eine Volumenzunahme aufgetreten, so trat sie spätestens 20 Minuten nach Verbringen der Erythrozyten in die Kochsalzlösung auf.

4. Zusammenhang zwischen Gipfelvolumen einer gewaschenen und ungewaschenen Erythrozytenpopulation.

Beim Waschen sind die Zellen hauptsächlich zwei schädigenden Einflüssen ausgesetzt: 1) der mechanischen Zusammensetzung während der Zentrifugation und 2) dem beabsichtigten systematischen Entzug des natürlichen Milieus, wobei auch die der Membran anhaftenden Substanzen immer mehr desorbiert werden.

Versuch: 5 ml Venenblut gesunder Blutspender wird in der beschriebenen Weise gewonnen und 3 x 10 Minuten bei Zimmertemperatur mit 800 g zentrifugiert (Christ-Zentrifuge Junior 1, Rotorradius 15 cm). Die jeweilige Wiederaufschwemmung erfolgt in 10 ml gepufferter physiologischer Kochsalzlösung. Die Volumensverteilung wird sofort und nach jedem Zentrifugationsgang bestimmt.

Ergebnis: Es wurden 10 Blute untersucht. Bei 6 der aufgestellten Zentrifugationsreihen war im Rahmen der Meßstreuung keine Gipfelverschiebung zu erkennen, die Kurven waren annähernd deckungsgleich. Bei 4 Bluten war eine Rechtsverschiebung um maximal 15 % zu verzeichnen. Die

durch die Zentrifugation bedingte mechanische Belastung hatte keine zusätzliche, sich in einer Volumensänderung zeigende, Zellschädigung zur Folge.

5. Einfluß des gerinnungshemmenden Mittels auf das Gipfelvolumen einer Erythrozytenpopulation.

Zur Ungerinnbarmachung von Blut werden im allgemeinen 3 Zusätze verwendet: 1) Natriumzitrat, 2) Ammonium- oder Natriumoxalat oder 3) Heparin. Für diese 3 Substanzen wurde der Einfluß auf das Volumen menschlicher Erythrozyten untersucht.

Versuch: Zu je 10 Blutproben gesunder Spender wird einmal 20 % einer 3,8 %igen Natriumzitratlösung, einmal 10 % einer 1,3 %igen Natriumoxalatlösung und einmal 10 % Vetrenlösung gegeben. Die Blute werden gut mit dem Antikoagulans vermischt. Alle Proben wurden sogleich und nach 36 stündiger Aufbewahrungszeit bei 40°, vermessen. Meßbedingungen wie schon beschrieben.

Ergebnis: Bei sofortiger Messung verhielten sich die Gipfelvolumina von Zitrat- und Vetrenblut identisch. Die Gipfelvolumina der Oxalatblute lagen bei 5 Bluten an der gleichen Stelle, bei den 5 anderen im Mittel um 7,5 % nach rechts verschoben. Nach 36 Stunden hatte sich das Verteilungsbild deutlich verschoben. Bei Zitrat- und Vetrenzusatz war bei 60 % der Blute der Gipfelwert um 7,5 % nach rechts verschoben. Bei Oxalatzusatz war der Gipfelwert bei 30 % um 7,5 %, bei 70 % um 15 % nach rechts verschoben. Eine ebenso starke Verschiebung des Gipfelwertes hatte nur ein Zitratblut, jedoch kein Vetrenblut gezeigt. (Abb. 8)

Unter den Routinebedingungen einer Blutbank sind bei den geringen von uns benötigten Blutmengen keine genauen Volumensverhältnisse zwischen Blut und dem gerinnungshemmenden Mittel einzuhalten. Es wurde deshalb geprüft, ob eine Änderung des Gipfelvolumens von Erythro-

ten in Abhängigkeit von der zugesetzten Heparinmenge eintritt.

Versuch: Venenblut wird mit Vetrenlösung im Verhältnis von 5,10,50,100 und 300 % der Blutmenge versetzt und unter normalen Versuchsbedingungen vermessen.

Ergebnis: Auch unter den verwandten extremen Heparinzusatzmengen war keine Verschiebung des Gipfelvolumens zu verzeichnen.

6. Volumensverteilungskurven von Mischpopulationen.

Bei den etwa 300, mit dem neuen Gerät vermessenen Bluten trat nur noch in 9 Fällen eine zweigipfelige Verteilungskurve auf, die jeweils durch dreimalige Wiedervermessung gesichert wurde. Bei diesen Bluten entsprach der Hauptgipfel einem Volumen von etwa $75 \pm 4 \text{ u}^3$, der Nebengipfel einem Volumen von $95 \pm 4 \text{ u}^3$. Alle vermessenen menschlichen zweigipfeligen Kurven stammten von Spendern der Münchner Blutbank. (Abb. 9)

Zur Frage, welcher Abstand der Verteilungsmaxima zweier Populationen notwendig ist, um eine zweigipfelige Verteilungskurve zu erzeugen, bzw. um sich in einer Schulterbildung oder Kurvenverbreiterung bemerkbar zu machen, wurde Blute verschiedener Spezies getrennt und vermischt gemessen.

Versuch: Es werden außer menschlichen Bluten solche von Ratten mit einem durchschnittlichen Erythrozytenvolumen von 44 u^3 , Mäusen 48 u^3 , Pferden 53 u^3 , Schweinen 58 u^3 und Kaninchen 65 u^3 verwendet. (14) Die einzelnen Blute werden in gepuffelter physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, ihre Konzentration auf, bei allen Bluten genau übereinstimmender Werte, eingestellt und vermessen. Danach werden gleiche Anteile jeweils zweier oder dreier Spezies zusammengetan und gut vermischt, die Konzentration wird erneut kontrolliert und die Mischungen vermessen.

Ergebnis: Echte zweigipfelige Kurven konnten nur von den Mischungen gewonnen werden bei denen das Gipfelvolumen der Einzelpopulation um mindestens $20 \mu^3$ aufeinanderlag. Bis zu $10 \mu^3$ Differenz resultierte lediglich eine breitere Verteilungskurve bei steigendem Abstand der Maxima über eine Kurve mit Schulterbildung in eine solche mit zwei Gipfeln übergang. (Abb. 10) Eine dreigipfelige Kurve konnte auch bei einem jeweiligen Gipfelabstand der Einzelpopulation von $20 \mu^3$ in einer Mischung von drei verschiedenen Bluten nicht erzielt werden, hier machte sich die Verteilungsbreite der einzelnen Populationen bei dem niedrigen Anteil an der Gesamtkonzentration störend bemerkbar.

7. Einfluß verschiedener Kapillardurchmesser.

Bei Verwendung einer 100 μ Kapillare erhält man eine stark rechtsschiefe Verteilungskurve, außerdem verlangt der große Öffnungsdurchmesser von 100 μ eine hohe Verstärkung. Die mit diesen zwei Faktoren verbundene Ungenauigkeit mancher Aussagen veranlaßten uns, den Einfluß verschiedener Kapillardurchmesser auf Kurvenform und Meßgenauigkeit zu untersuchen.

Versuch: 10 Blutproben gesunder Spender werden nacheinander mit einer 100, 70, 50, und 30 μ Kapillare vermessen.

Bei der ersten Versuchsreihe wird die ursprüngliche Stromstärke von 1 mA belassen; die Verstärkung wird den Erfordernissen entsprechend variiert. Bei der zweiten Versuchsreihe wird die Stromstärke jeweils um den Faktor 2 verringert. Für die Kapillardurchmesser 100:70:50 gelten die Stromstärkenverhältnisse 100:50:25. Die Konzentration der Meßlösung beträgt 700 Erythrozyten/sec bei allen Versuchen.

Ergebnis: Das günstigste Verhältnis zwischen notwendiger Verstärkung, Kurvenform und Anzahl der Meßunterbrechungen durch auftretende Verstopfungen, liegt für unser Gerät bei der Verwendung der $70\text{ }\mu$ Kapillare. Die Verstärkung kann weit genug herabgesetzt werden und die Rechtsschiefe ist deutlich geringer. Diese Kapillare wird heute von uns fast ausschließlich verwendet.

Die Streubreite der Verteilung ist für die einzelnen Kapillaren bei variierter Stromstärke und damit gleicher Stromdichte für die gleiche Blutprobe gleich groß.

Eine Veränderung der Kurvenform im Sinn einer Zweigipfligkeit (16) trat, weder bei der höchsten von uns verwandten Stromstärke von 1 mA bei der $30\text{ }\mu$ Kapillare, noch bei der niedrigsten Stromstärke von 0,25 mA und der $100\text{ }\mu$ Kapillare, auf.

Bleibende Veränderungen konnten ja schon durch das Vermessen wiederaufgefangener Erythrozyten ausgeschlossen werden.

8. Vermessung andersgeformter Zellen.

a) Vergleich des Gipfelvolumens in physiologischer Kochsalzlösung und in Gowerscher Lösung aufgeschwemmter Erythrozyten.

Da ein Einfluß der Erythrozytenform auf die Form der Impulse und damit auf die Kurvenform vermutet wurde, wurden Erythrozyten einmal in Kochsalzlösung und einmal in Gowerscher Lösung (24, 25) vermessen. In Gowerscher Lösung kugeln Erythrozyten unter Volumenzunahme ab. Bei der Bestimmung des Gipfelvolumens ist die unterschiedlicher Leitfähigkeit der beiden Lösungen berücksichtigt worden.

Versuch: 10 verschiedene Blute werden unter Standardbedingungen in den beiden Lösungen aufgeschwemmt und die jeweiligen Verteilungskurven gemeinsam aufgetragen.

Ergebnis: In Gowersscher Lösung erfolgt der Anstieg der Kurven schneller, die Rechtsschiefe ist in allen Fällen deutlich zugunsten einer Glockenform verringert, der zweite Gipfel, durch Doppeldurchtritte bedingt, verschwunden. (Abb. 11)

Bei ebenfalls vermessenen Latexpartikeln ist die Kurvenform in beiden Lösungen identisch, das Maximum entsprechend dem unterschiedlichen spezifischen Widerstand verschoben. Die Kurven sind nach entsprechender Korrektur deckungsgleich.

Vermessung von Leukozyten.

Die Zählung und Volumenmessung von Leukozyten wird durch ihre niedrige Anzahl im Verhältnis zur Erythrozytenzahl erschwert. Es wurden von mehreren Autoren verschiedene Anreicherungsverfahren ausgearbeitet, von denen in unserer Arbeitsgruppe hauptsächlich die Schrägsenkung unter Zusatz von Hostacain und die Zerstörung der Erythrozyten mit Saponin angewendet werden. (26, 27, 28) Beide liefern für die Volumenbestimmung gleich gute und identische Resultate. Die Zerstörung der Erythrozyten mit Saponin ist einfacher und schneller, erfordert jedoch ein rasches Arbeiten, da nach ungefähr 20 Minuten auch die Leukozyten zu zerfallen beginnen.

Versuch: Die Leukozyten aus dem Blut verschiedener Spender werden einmal mittels Schrägsenkung und zum anderen durch Zerstörung der Erythrozyten mit einem Tropfen 2 %iger Saponinlösung angereichert, in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und unter Standardbedingungen vermessen.

Ergebnis: Das Gipfelvolumen der Leukozyten liegt bei dem etwa dreifachen Wert des Erythrozytengipfelvolumens. Die Verteilungskurve ist eingipfelig, eine Differenzierung in Granulozyten und Lymphozyten war nicht zu erzielen (Abb.12).

Vermessung von Spermien verschiedener Spezies.

Von mehreren Autoren wurde bereits der Versuch unternommen das Leitfähigkeitsmeßprinzip zur Zählung und Größenbestimmung von Spermien zu verwenden. (29, 30) Auch von uns wurde versucht Verteilungskurven der Spermiovolumina von Mensch, Bulle, Eber und Kaninchen zu erhalten.

Vermessung von Menschen- und Kaninchenspermien aus Ejakulaten:

Trotz verschiedener Aufarbeitungsmethoden, wie Filtration, Absorption an Glaskugeln, wobei inerte Partikel und tote Spermien absorbiert werden sollen, und Zentrifugation ist es uns noch nicht gelungen bei Mensch oder Kaninchen mehr als den abfallenden Schenkel der Verteilungskurve zu gewinnen. Die Verunreinigung der Ejakulate mit Partikeln unterschiedlicher Herkunft, die in ihren Dimensionen die mittlere Spermiengröße nach oben und unten wesentlich überragen, ist bei diesen beiden Spezies zahlenmäßig so hoch, daß jede Ermittlung einer Verteilungskurve im wesentlichen nur eine Volumenverteilung der Beimengungen darstellt. Sollte es gelingen die Spermien mittels trägerfreier Elektrophorese selektiv zu trennen, wird eine weitere Bearbeitung dieses Problems sinnvoll.

Vermessung von Bullen- und Eberspermien aus Ejakulaten.

Bullen- und Eber ejakulate zeigen geringe Beimengungen und nach mehrmaligem Waschen erhält man saubere Spermien-suspensionen.

Versuch: Die bis zur Verwendung von 4° aufbewahrten Ejakulate werden in der Kälte dreimal zentrifugiert, (Servall-Winkel-Zentrifuge Typ SS-1 a 15 000 UpM) das Sediment wird jeweils mit physiologischer Kochsalzlösung aufgeschüttelt. Die Verteilungskurven werden bei 23° aufgenommen.

Ergebnis: Das mittlere Gipfelvolumen von Bullenspermien lag bei allen Verteilungen bei $2/3$ des mittleren menschlichen Erythrozytengipfelvolumens, etwa $60 \pm 8 \mu^3$. Die vermessenen Eberspermien waren im Mittel um 15 % größer. Es wurden 10 Bullenejakulate und 6 Eberejakulate vermessen. (Abb. 13, 14)

Getrennte Vermessung von Bullenspermien aus Nebenhodenkopf und Nebenhodenschwanz.

Spermien aus dem Kopf- und Schwanzteil des Bullennebenhoden zeigen eine unterschiedliche elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit. (31) Es war deshalb zu prüfen, ob auch ein unterschiedliches Volumen vorliegt.

Versuch: Nebenhodenkopf und -schwanz werden freipräpariert, aufgeschnitten und die Spermien ausgewaschen. Die Spermien werden in gleicher Weise wie oben durch Zentrifugieren weitergereinigt. Die in üblicher Weise gewonnenen Verteilungskurven werden gemeinsam aufgetragen.

Ergebnis: In allen 5 Fällen war das Gipfelvolumen der Nebenhodenkopfspermien gegenüber dem der Nebenhodenschwanzspermien nach rechts verschoben; die Verteilungskurve war breiter, die Streuung also größer. (Abb. 15)

Diskussion

Mit der Entwicklung des Widerstandsmeßprinzips ist ein wesentlicher Fortschritt für die genaue Bestimmung von Z e l l k o n z e n t r a t i o n e n erzielt worden. Problematisch bleibt, inwieweit die auf dieser Methode basierende Bestimmung von Z e l l v o l u m i n a zuverlässig ist, da das Verfahren von Coulter in erster Linie für die Volumensbestimmung inerter Partikel entwickelt worden ist. Bei inerten Partikeln sind Tonizitätsänderungen, Temperaturschwankungen oder Strombelastungen lediglich wegen der erforderlichen Korrekturfaktoren von Bedeutung, mit denen die entstandenen Leitfähigkeitsänderungen rechnerisch eliminiert werden können, während die gleichen Änderungen bei der Arbeit mit biologischem Material ein ernstes Meßproblem darstellen. Die damit verbundenen Fragen sind schon von zahlreichen Autoren aufgeworfen und mit einer Reihe grundlegender Versuchsanordnungen untersucht worden. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war, einige neue Gesichtspunkte beizusteuern, die sowohl die Problematik biologischer Untersuchungsmaterialien als auch die prinzipiellen Schwächen der Impulsgewinnung und -verarbeitung betreffen, und diese an einem neu entwickelten Gerätemodell zu erproben und zu belegen. Diese Aufgabe wurde teilweise in Zusammenarbeit mit einem Elektronikingenieur durchgeführt.

Ausgangspunkt für die folgenden Untersuchungen waren zwei Befunde, die bei Anfertigung von Volumensverteilungskurven von Erythrozyten mit dem Coulterschen Zählgerät Modell A mit gewisser Regelmäßigkeit auftraten: 1. eine

deutliche Rechtsschiefe und 2. eine Mehrgipfligkeit der Verteilungskurve.

Beide Phänomene sind bei biologischen Größen bekannt. Eine Mehrgipfligkeit im Durchmesser menschlicher Erythrozyten kann im Verlauf der Behandlung verschiedener Anämien auftreten, wie aus Price-Jones-Kurven hervorgeht, wenn sich z.B. während der Blutmauserung neben Ovalozyten bzw. Mikrosphärozyten in stärkerem Maß normale gesunde Erythrozyten einfinden.

Da es sich aber bei den vorliegenden Untersuchungen um Blutproben gesunder Spender handelte, fällt diese Erklärung für die Mehrgipfligkeit der Kurven weg. So schien es angezeigt zu prüfen, ob nicht physikalische Effekte diese Kurvenform vortäuschen können.

Grundlage der erzielten Volumensverteilung ist der Einzelimpuls, der einer eingehenden Analyse unterzogen wurde. Eine fotografische Dokumentation undiskriminierter Primärimpulsfolgen, die vor dem Verstärker des Coulterschen Geräts abgefangen und unverfälscht auf einem Oszillografen wiedergegeben wurden, zeigten bei genügender Spreizung eine Rechtsschiefe der Scheitelhöhe, weiter eine sehr unterschiedliche Impulslänge, wobei die mittlere Länge einen Mehrfachen der errechneten Durchtrittszeit der Kapillare entsprach, sowie schließlich eine den theoretischen Erwartungen nicht entsprechende Form der Koinzidenzimpulse.

Brecher (16) nahm bereits an, daß das aktive Kapillarvolumen, infolge zunehmender Verdichtung der Feldlinien vor und hinter der Öffnung, dem drei- bis vierfachen des tatsächlichen Öffnungsvolumen entsprechen müsse. Dies bedeutet, daß die tatsächliche Impulslänge

gegenüber der Durchtrittszeit durch die Kapillaröffnung selbst von weniger als 17 μ sec auf mindestens das Doppelte verlängert sein muß. Demgegenüber bedeuten unsere mittleren Impulslängen von 50 μ sec, daß die aktive Kapillarlänge sogar der etwa dreifachen Kapillarlänge entsprechen muß. Die gelegentlich auftretenden gestreckten Impulse mit Längen von über 100 μ sec entsprechen möglicherweise den von Kubitschek (17) geforderten Randstromimpulsen, die aus dem toten Winkel seitlich von der Öffnung in den schnellen Zentralstrom angesaugt werden, oder sogar im langsamen Randstrom die Kapillare passieren sollen; denn nicht alle Zellen dürften die Kapillare perlschnurartig aufgereiht im Zentralstrom durchlaufen.

Die Ursache der Rechtsschiefe der meisten Einzelimpulse war mit den uns zur Verfügung stehenden Mitteln nicht eindeutig zu klären. Die Kapillaröffnung hat eine rein zylindrische Bohrung und ist somit nicht für eine rechtsschiefe Impulsform verantwortlich. Außerdem müßten in diesem Falle alle Impulse rechtsschief sein. Als Ursache für die Rechtsschiefe sind im Wesentlichen vier Möglichkeiten zu diskutieren:

1. Eine Geschwindigkeitsänderung der Zellen im Sinn einer Abbremsung nach Passage des Loches, die auf die Abknickung der Strömung im Inneren der Kapillare zurückzuführen wäre. Daß die zunächst laminare Strömung auf der Innenseite der Kapillare in eine Turbulenz übergeht, die die Zellen am sofortigen Verlassen des elektrisch aktiven Kapillarfeldes hindern könnte, wurde durch Injektion eines dünnen Farbstrahls in die Suspension unmittelbar vor der Kapillare mikroskopisch nachgewiesen.

2. Eine Lageänderung der Zellen unmittelbar nach der Kapillarpassage. Wir wissen bis heute weder, ob die Erythrozyten mit der Kante oder der Breitseite voran die Kapillare passieren, noch, ob Form- oder Lagefaktoren der Erythrozyten während der Passage die Impulsform- und höhe beeinflussen. Die von Coulter gegebenen Berechnungen beziehen sich auf eine zylindrische Partikel mit der Kapillarform proportionalen Dimensionen. Eine Lageänderung der Erythrozyten kann aber aufgrund der unter 1 diskutierten Turbulenz am Ende der Kapillarpassage eintreten und die Form des abfallenden Impulsschenkels verändern.

3. Eine Formänderung der Zellen im Verlauf der Kapillarpassage. Erythrozyten haben eine strömungsdynamisch sehr ungünstige Form, die große Oberfläche steht in einem schlechten Verhältnis zum Volumen, so daß eine Formänderung bei der starken Beschleunigung von 0 auf fast 15 Stundenkilometer und einer nicht ganz so raschen Abbremsung, denkbar wäre. Dies könnte einen impulsverlängernden Einfluß haben.

4. Membranveränderungen im Sinne einer Koagulation. Sie könnten durch die unter den Meßbedingungen sehr hohe Felddichte und die dadurch bedingte elektrische und thermische Belastung der Zellen verursacht sein.

Der Widerstand zwischen den Elektroden wird fast ausschließlich durch die Dimensionen der Kapillaröffnung bestimmt. Die hierbei entstehende nicht unbeträchtliche Temperaturerhöhung läßt sich aus den inzwischen bekannten physikalischen Daten errechnen:

$$R = \frac{\rho \times l}{r^2 \times \pi}$$

R = Widerstand in Ohm

ρ = Spez. Widerstand einer NaCl-Lsg. =
70 Ohm x cm für physiol. NaCl-Lsg.

l = Kapillarlänge = 70 μ = 70×10^{-4} cm

$r^2 \pi$ = Querschnitt = $7850 \mu^2 = 7850 \times 10^{-8} \text{ cm}^2$

$$R = \frac{70 \text{ cm} \times 70 \times 10^{-4}}{7850 \times 10^{-8} \text{ cm}^2}$$

$$R = 6,25 \times 10^3 \text{ Ohm} = 6,25 \text{ kOhm}$$

Die Widerstandsarbeit beträgt:

$$A_e = I^2 \times R \times t$$

A_e = Widerstandsarbeit in Wattsec.

I = Stromstärke in Ampere bei 1 mA

t = Zeit in Sekunden

$$A = 1,0 \times 10^{-6} \times 6,25 \times 10^3 \times 1,0$$

$$A = 6,25 \times 10^{-3} \text{ Wattsec.}$$

$$A = 6,25 \text{ mWattsec.}$$

Die einer Wattsekunde äquivalente Wärme beträgt 0,239 cal und damit gilt:

$$A_w = 6,25 \times 10^{-3} \times 0,239 \quad A_w = \text{Widerstandsarbeit in Wärmeeinheiten}$$

$$A_w = 1,49 \times 10^{-3} \text{ cal}$$

Es werden also in jeder Sekunde bei unbewegter Flüssigkeit in der Öffnung einer 100 μ -Kapillare $1,49 \times 10^{-3}$ Kalorien frei. Das Kapillarvolumen beläuft sich auf $0,55 \times 10^{-3}$ ml, so daß pro Sekunde eine kontinuierliche Erwärmung um annähernd $2,7^\circ$ erfolgt. Da der Durchfluß pro Sekunde $0,033$ ml beträgt, sinkt die Erwärmung auf etwa $44,7 \times 10^{-3}$ cal/ml, bzw. $0,0447$ Grad.

Ohne angelegten Sog müßte also bei den am Coulterschen Gerät gegebenen Arbeitsbedingungen eines fließenden Elektrodenstroms innerhalb weniger Sekunden eine Zerstörung der Zellen erfolgen. Daß jedoch unter den normalen Arbeitsbedingungen keine Zellveränderungen zu verzeichnen sind, zeigen die mit dem neuen Gerät unter standardisierten Bedingungen durchgeführten Wiedervermessungen von Erythrozytenpopulationen, die bereits einmal die Kapillare passiert hatten: Die Verteilungskurven waren annähernd deckungsgleich. Somit kann die vierte der genannten Erklärungsmöglichkeiten für die Rechtsschiefe der Einzelimpulse mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Bei den fotografischen Aufnahmen von Impulsserien waren neben den Einzelimpulsen auch Impulsformen aufgetreten, die durch zwei oder mehr dicht aufeinanderfolgende Zellen ausgelöst worden waren. Wären die Zellabstände gleichmäßig, so müßten sich bei einer Impulslänge von 17 Mikrosekunden noch 60 000 Zellen pro Sekunde koinzidenzfrei zählen und diskriminieren lassen; bei der gemessenen Impulslänge von im Mittel 50 Mikrosekunden wären es immer noch 20 000 Zellen pro Sekunde. Die mit zunehmender Konzentration immer häufiger werdenden kombinierten Impulse sind also darauf zurückzuführen, daß die Zellen nicht gleichmäßig, sondern statistisch verteilte Abstände haben, wie anzunehmen war.

Die Form dieser Impulszüge war überraschend. Es ergaben sich deutliche Diskrepanzen zu den bisher theoretisch angenommenen Koinzidenzimpulsformen. Die Breite der Einzelimpulse hatte bereits gezeigt, daß die aktive Kapillarlänge größer ist, als man erwartet hatte. Dicht aufeinanderfolgende Zellen erzeugen in der Regel einen M-förmigen Impuls, da sich der abfallende Schenkel des ersten

und der ansteigende Schenkel des zweiten Impulses überlagern. Bei sehr enger Aufeinanderfolge ergeben sich Schulterbildungen im Impulszug. Doppelt hohe Impulse bei gleicher Breite traten zwar selten, aber häufiger auf, als es der statistischen Wahrscheinlichkeit entsprochen hätte.

Aus den gewonnenen Bildern wurde verständlich, weshalb sich mit Hilfe der Coulterschen Korrekturfaktoren so genaue Zellzählungen erzielen lassen: Seine Elektronik differenziert die Impulse vor der Diskriminierung zweimal und wertet nur die negativen Anteile der entstandenen Kurvenzüge aus. Durch diesen Kunstgriff lassen sich durch Überlagerung entstandene Impulszüge weitgehend in ihre Komponenten zerlegen. Jeder Steigungsabfall am Originalimpuls führt zu einem Spannungsabfall beim abgeleiteten Impuls, jeder Spannungsabfall beim Originalimpuls, auch im Verlauf von Mehrfachdurchtritten, zu einem Unterschreiten der Spannungs-Nulllinie. Bei dieser Art der Auswertung wird das Zählergebnis mit Ausnahme echter Koinzidenzen sehr gut korrigiert, die Größenbestimmung der Impulse wird jedoch erheblich verfälscht, da die an einem Punkt vorhandenen Spannungen sich addieren und zu einer Impulsüberhöhung führen müssen. Dieser Fehler wird durch Differenzierung nicht beseitigt. Bei zunehmender Suspensionskonzentration muß dadurch das Gipfelvolumen, also die registrierte mittlere Einzelzellgröße unter gleichzeitig zunehmender Rechtsschiefe der Verteilungskurve immer mehr in Richtung auf ein größeres Volumen hin verschoben werden.

Das Auftreten von Schultern und zweiten Gipfeln in der Verteilungskurve beim doppelten Einzelzellvolumen läßt sich aus den abgebildeten Impulsserien ebenfalls erklären.

Die Vermessung von 70 Impulsabständen in Mikrosekunden ergab, daß die Abstände nur bis zu einem bestimmten Wert der statistischen Wahrscheinlichkeit nach abnehmen, um dann einen deutlichen Sprung zum völligen Zusammentreten der Zellen zu machen.

Die an den Einzelimpulsen und Impulsserien gewonnenen Erkenntnisse führten zur Entwicklung einer neuen Art der Impulsverarbeitung, die eine genauere Volumensmessung erlaubt, in dem sie verformte Impulse völlig der Bewertung entzieht. Der Originalimpuls wird nur noch zur Auslösung eines Nadelimpulses konstanter Breite und einer dem Originalimpuls proportionaler, d.h. der mit dem Diskriminator jeweils eingestellten Größenklasse entsprechenden Höhe, verwendet.

Prinzipiell sind Diskriminatoren - elektronische Schranken - so gebaut, daß eine Diode mit einem der Impulsspannung entgegengesetzten Potential vorgespannt wird, dessen Höhe der Diskriminatorschwelle entspricht. Überschreitet der Impuls diesen Wert, so wird er registriert und weitergegeben. Da Dioden eine sogenannte "schädliche Kapazität" haben, wird der Impuls mit zunehmender Steilheit d.h. größerer Anstiegsgeschwindigkeit auch dann weitergegeben, wenn er den eingestellten Schwellenwert nicht zu erreichen vermag. In dem neuen Gerät wurden deshalb Tunneldioden verwendet, die jedoch eine Umwandlung des Spannungsimpulses in einen entsprechenden Stromimpuls verlangen: Bei Erreichen eines bestimmten Stromwertes gibt die Tunneldiode einen Spannungsimpuls von etwa 0,5 Volt ab, da sie infolge ihrer geknickten Kennlinie sofort auf den nächsten stabilen Arbeitspunkt überspringt. Eine zweite Tunneldiode gibt einen Impuls ab, sofern die obere Diskriminator-schwelle ebenfalls passiert wird, der Originalimpuls also

größer, als die durch das Fenster eingestellte Klassengrenze ist. Die von den Tunnelnioden abgegebenen Impulse werden von sogenannten Kurzzeitspeichern eine gewisse Zeit festgehalten. Bei deren Zurückkippen in die Ruhelage entsteht ein Löschimpuls mit umgekehrtem Vorzeichen. Erst dieser Impuls wird weiterverarbeitet. Ist der zweite Kurzzeitspeicher infolge Passierens der oberen Schwelle ebenfalls "gesetzt" worden, so ist er durch seine längere Laufzeit zum Zeitpunkt der Löschung des ersten noch auf seinem Potential und vernichtet dadurch den entgegengesetzt gerichteten Löschimpuls des ersten Speichers. Gezählt werden also nur Impulse, deren Höhe größer als der Vorstrom der ersten und kleiner als der Vorstrom der zweiten Tunnelnioden ist.

Die angegebene Schaltung ist ausreichend für eine exakte Diskriminierung einlaufender Einzelsignale, verhindert jedoch nicht die Bewertung von Impulszügen koinzidierender Impulse. Um dies auszuschließen, wird ein Impuls erst dann gezählt, wenn seinem Maximum ein Minimum von mehr als 10 % des gesamten Diskriminatorbereiches folgt, und wenn der Scheitelpunkt spätestens nach 20 Mikrosekunden erreicht ist. Werden diese Bedingungen nicht erfüllt, wird der Impuls vor Erreichen des Zählwerks gelöscht. Die meisten M-förmigen Impulse können durch die erste Bedingung, die meisten schulterförmigen Impulse durch die zweite Bedingung eliminiert werden, da die mittlere Anstiegszeit bei 15 Mikrosekunden liegt.

Die angegebene Diskriminationsweise mit einem elektronischen Fenster, die ein rascheres Arbeiten ermöglicht und bereits eine differenzierte Verteilungskurve liefert, wurde in der Zwischenzeit auch von Coulter bei seinem Modell B auf anderem Wege erzielt. Neu ist dagegen noch

die erstmals bei unserem Gerät angewendete Zähl- und Diskriminierweise auf Promillebasis, deren Arbeitsweise auf Seite 14 erläutert wurde. Sie hat sich sehr gut bewährt.

Ein wesentliches Problem des Widerstandsmeßprinzips bleibt der Zusammenhang zwischen Stärke des Elektrodenstroms, Größe der Kapillaröffnung und Verstärkung. Es konnte nachgewiesen werden, daß eine Änderung von Verstärkung und Stromstärke keine Verzerrung der Verteilungskurven zur Folge haben, sondern lediglich die unter proportionaler Verbreiterung oder Verschmälerung der Verteilung geforderte Verschiebung auf der Diskriminatorabszisse bewirken, so daß auch sehr große oder sehr kleine Zellpopulationen in den Meßbereich geführt werden können. Leider ist dies nach unten nicht unbeschränkt möglich, da eine Erhöhung der Stromstärke wegen der damit verbundenen Belastung des biologischen Materials nicht unbedenklich ist und eine Verstärkung nicht in jedem Fall zu einem wesentlichen Gewinn in der Diskriminierfähigkeit führt; denn das Rauschen der Elektronik wird im gleichen Maße mitverstärkt und gerät in den Größenbereich der Nutzsignale.

Die Wahl einer engeren Kapillare hat die gleiche Wirkung wie eine Erhöhung des Elektrodenstroms, bringt dabei jedoch zusätzlich die Gefahr einer leichteren Verstopfung, was vor allem bei einem langsamen Einengen der Öffnung nicht sofort bemerkt wird und zu einer falschen Impulshöhenanalyse führt. Engere Kapillaren ergeben andererseits steilere Verteilungskurven; die Rechtsschiefe wird geringer, ein Nebengipfel beim doppelten Einzelzellvolumen tritt deutlich hervor. Die schmalere Verteilungsbreite ist darauf zurückzuführen, daß bei kleinerer Kapillar-

öffnung mit wesentlich geringerer Verstärkung gearbeitet werden kann.

Bedeutsam war, daß auch die neue Elektronik eine Rechtschiefe in der Volumenverteilung lieferte, daß jedoch Mehrgipfligkeiten, auch bei engstem Meßpunkteabstand mit Ausnahme derjenigen beim doppelten Einzelzellvolumen kaum mehr in Erscheinung traten.

Der an dem Coulterschen Gerät erhobene reproduzierbare Befund einer etwa 20 Minuten nach Meßbeginn erfolgenden Schwellung der Zellen bis knapp unterhalb des Hämolysevolumens, konnte mit dem neuen Gerät infolge der geänderten Meßbedingungen - in den Meßpausen fließt kein Strom - nicht erhoben werden. Ein Anschwellen der Erythrozyten wurde nur in insgesamt 4 von über 500 geprüften Fällen beobachtet und ist vermutlich auf eine geringere osmotische Resistenz der Erythrozyten einzelner Spender zurückzuführen.

Biologische Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Arbeit bewußt auf solche Versuchsanordnungen beschränkt, denen eine prinzipielle Bedeutung für den Meßvorgang zukommt. Auf die Verwendung inerter Partikel zur Impulsanalyse wurde verzichtet, da einerseits die zur Diskussion stehenden Verteilungskurven ausschließlich an biologischem Material erhoben wurden, und zum anderen es schwierig ist geeignete Teilchen zu finden, die nicht wegen ihrer Form- und Größenabweichungen gegenüber Erythrozyten weitere Unsicherheitsfaktoren und Fehlerquellen schaffen. Zielsetzung der biologischen Versuchsgruppen war 1.) die günstigsten Versuchsbedingungen zu ermitteln und 2.) die Anwendbarkeit des Geräts für verschiedenartige Zellsuspensionen zu prüfen.

Eine Absoluteichung des Geräts war in diesem Zusammenhang uninteressant. Gegen die oftmals hierfür verwendeten und

auch uns zur Verfügung stehenden kleinen Latexpartikel sprechen die bereits angeführten Einwände. Größere Kugeln mit einem den Erythrozyten äquivalenten Volumen zeigen außerdem eine sehr hohe Streubreite. Die aufwendige biologische Eichung über Hämatokrit und Zellkonzentration einer größeren Anzahl von Blutproben wäre zwar möglich gewesen, hätte jedoch jedesmal wiederholt werden müssen, wenn die elektronischen Versuchsaufbauten und damit die Normwerte geändert wurden. Da sich die Volumensverteilungskurve aus dem Kapillarblut ein und desselben Spenders über Monate hin als sehr formstabil erwies, wurden alle Meßergebnisse auf eine solche Vergleichspopulation bezogen. Die repräsentative Zuverlässigkeit dieser Kurve wurde durch Vergleich mit einer Normkurve, die aus dem Venenblut von 100 gesunden Blutspendern gewonnen wurde, belegt. Abweichungen und Volumenschwankungen wurden entweder auf die Standardkurve bezogen, oder in Prozentwerten des jeweiligen Gipfelvolumens angegeben. Untersuchungen mit pathologisch veränderten Blutzellen wurden nicht durchgeführt.

Von zentraler Bedeutung sind die im Laufe des Meßvorgangs auftretenden Zellveränderungen und deren Rückwirkung auf die registrierte Zellgröße. Hier interessierte zunächst, auf welche Weise das Zellvolumen am sichersten stabilisiert werden könnte. Wie sich aus unseren Versuchen ergab, spielt die Aufbewahrungszeit von Nativblut während der normalen Versuchszeiträume keine Rolle. Bei 100 untersuchten Blutproben begann erst nach 24 Stunden eine geringfügige Volumenzunahme. Bei Ausschwemmung der Zellen in physiologischer Kochsalzlösung konnte nur bei einem Teil der Blute der von BRECHER stets beobachtete initiale Volumensanstieg ebenfalls nachgewiesen werden. Diese Diskrepanz ist mögli-

cherweise auf eine unterschiedliche Pufferung der Salzlösung zurückzuführen. In dieser Lösung blieb das Erythrozytenvolumen auch noch über mehrere Stunden außerordentlich konstant.

Eine wesentlich stärkere Beanspruchung stellt das für viele biologische Untersuchungen unumgängliche Waschen der Zellen dar, bei dem unter extremer mechanischer Beanspruchung gleichzeitig eine zunehmende Desorption der Membran anhaftender Substanzen erfolgt. Auch hierbei zeigte sich überraschenderweise keine signifikante Volumenzunahme, bzw. Hämolyse. Letzteres konnte durch laufende Kontrolle der Zellzahl und eine Hämoglobin-Mikrobestimmung im Überstand gesichert werden. Das in der Klinik immer wieder beobachtete Hämolytischwerden von Plasmen oder Seren scheint deshalb im wesentlichen als Sichtbarwerden einer bereits primär vorhandenen oder während der Blutentnahme aufgetretenen Hämolyse zu deuten zu sein.

Einen wichtigen Befund im Hinblick auf weitere biologische Arbeiten bilden die Ergebnisse der in Abb. 8 dargestellten Antikoagulantienversuche, denen auch eine klinische Bedeutung zukommt. Zusätze von Oxalat zur Gerinnungshemmung mußten von uns wegen ihres starken Einflusses auf das Erythrozytenvolumen ausgeschieden werden, während sich zwischen Heparin und Natriumzitrat keine Unterschiede in der Eignung aufzeigen ließen. Sie haben beide wenig Einfluß, sowohl auf das Sofortvolumen, als auch in der Zeitreihe. Heparin wurde für die weiteren Arbeiten deshalb bevorzugt, weil es, wie eine Konzentrationsreihe gezeigt hat, zusätzlich noch unabhängig von der zugesetzten Menge macht. Es kann also prinzipiell auch mit einem im Auffangröhrchen fein verteilten Heparin-Trockenpulver gearbeitet und somit eine Blutverdünnung vermieden werden.

Untersuchungen an Mischpopulationen geben immer wieder zu

Irrtümern Anlaß. Sie geben keinen Aufschluß über das Auflösungsvermögen des Geräts, sondern das Gelingen oder Mißlingen einer Auftrennung ist in erster Linie eine Funktion der Verteilungs *b r e i t e*. Sie wurde von uns durchgeführt um quantitative Hinweise über die mit dem Coulter-schen Gerät Modell A häufig, mit dem neuen Gerät nur noch selten aufgetretenen mehrgipfligen Verteilungskurven menschlicher Erythrozyten zu erhalten. Es wurden dabei Blute verschiedener Spezies gemischt, deren mittleres Zellvolumen bekannt ist. Zur Sicherung wurde das mittlere Zellvolumen des Spendertieres zusätzlich aus Hämatokrit und Zellkonzentration ermittelt. Die Verteilungsbreite entsprach annähernd derjenigen menschlicher Erythrozyten. Dabei ließ sich erst bei einem Gipfelabstand von über $10 \mu^3$ eine Schulterbildung, ab $20 \mu^3$ ein Auftreten zweier getrennter Gipfel erzielen, wohingegen Gipfelverschiebungen einer Einzelpopulation unter den Versuchsbedingungen bereits ab $5 \mu^3$ reproduzierbar nachzuweisen waren. Mit der Vermessung andersgeformter Zellen sollte in erster Linie ein Zusammenhang zwischen Zellform und Verteilungskurve geprüft werden. Hierfür wurden zunächst noch einmal die Versuche mit Gowers'scher Lösung aufgegriffen. Der unter Freisetzung von Hämoglobin sofort auftretende starke Volumensanstieg war bekannt. (eine Korrektur für die andere Leitfähigkeit Gowers'scher Lösung war nur in geringem Maße erforderlich, da das neue Gerät ebenso wie das Coulter'sche Modell B in weitem Bereich unempfindlich gegen Leitfähigkeitsänderungen der Suspensionslösung ist). Auffallend war jedoch die Änderung der sonst rechtsschiefen Kurve zugunsten einer angenäherten Glockenform, die in Abb. 11 deutlich zum Ausdruck kommt. Eine sichere Deutung dieses Phänomens ist noch nicht möglich. Zu berücksichtigen sind neben dem bekannten Abkugeln der Erythrozyten in Gowers'scher

Lösung sämtliche bei der Besprechung der Einzelimpulsform diskutierten Möglichkeiten.

Leukozyten ergaben eine saubere Volumensverteilung, deren Gipfelvolumen unabhängig von dem angewendeten Anreicherungsverfahren bei dem etwa dreifachen Erythrozytenwert lag. Eine Auftrennung der weißen Zellreihe war aus der Gesamtverteilung nicht ersichtlich. Eine präparative Auftrennung und getrennte Vermessung wurde bisher noch nicht durchgeführt.

Untersuchungen an Spermienaufschwemmungen des Menschen waren weitgehend unbefriedigend, da bisher kein zuverlässiges Verfahren zur Isolierung der Spermien aus den zahlenmäßig überwiegenden Ejakulatbeimengungen erzielt werden konnte. Bei der Untersuchung von Bullen- und Eberejakulaten, die physiologischerweise keine stärkeren Verunreinigungen zeigen, konnte eine saubere Volumensverteilungskurve aufgestellt werden. Bei der getrennten Vermessung der Spermien aus Nebenhodenkopf und -schwanz des Bullen zeigte sich eine reproduzierbare Abweichung der Volumensverteilungskurve: die Spermien aus dem Nebenhodenkopf sind deutlich größer, zeigen dabei jedoch eine größere Streubreite des Volumens, als diejenigen aus dem Nebenhodenschwanzteil.

Dieser unerwartete Befund zeigt, daß sich für die Zellvolumensbestimmung durch Widerstandsmessung neben den bekannten Fragestellungen noch neue interessante und bisher unerschlossene Arbeitsgebiete finden.

Zusammenfassung

Das Coultersche Meßprinzip zur Bestimmung der Konzentration und Volumenverteilung von Zellsuspensionen wurde einer kritischen Prüfung unterzogen.

Eine Reihe von Versuchen mit dem Originalgerät (Modell A) hatte das Ziel durch Vergleich mit eigenen Meßanordnungen den Einfluß meßtechnischer Artefakte auf das Zähl- und Diskriminiererergebnis abzugrenzen.

Die eigenen Versuchsaufbauten dienten außerdem der Überprüfung der physikalischen Grundlagen des Verfahrens. Insbesondere wurde die Gestalt der Einzelimpulse und Impulszüge, sowie der Zusammenhang zwischen elektrischen und mechanischen Größen eingehend untersucht.

Ein auf den Ergebnissen basierendes neues Gerätemodell (Diplomarbeit Jürgen Gutmann 1963) wurde an einer Reihe biologischer Versuchsanordnungen mit Erythrozytensuspensionen auf seine Verwendbarkeit geprüft und durch gleichzeitige Verbesserungen methodischer Art eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erarbeitet. Auch Untersuchungen mit anders geformten Zellen (artefiziell verformte Erythrozyten, Leukozyten und Spermien) ergaben brauchbare Werte. Absoluteichungen wurden nicht vorgenommen.

Messungen an Bullenspermien zeigten, daß deren Ausreifung ebenso wie beim Erythrozyten mit einer Volumenabnahme einhergeht.

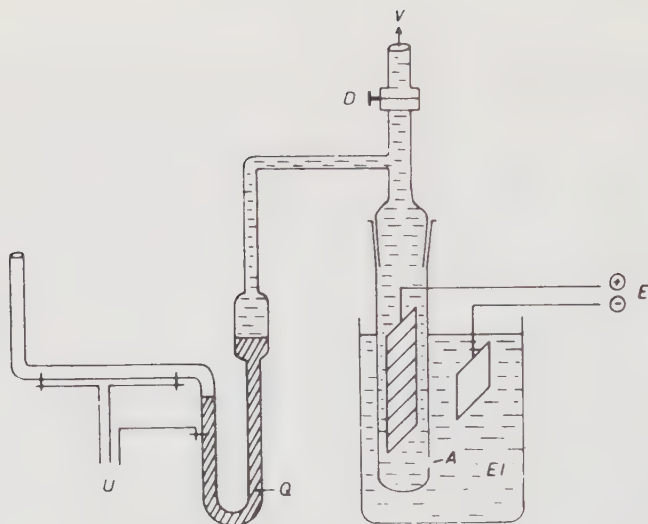


Abb. 1: Vereinfachtes Schema der Meßapparatur: A = Kapillar-
öffnung, V = Sogrichtung, Q = Quecksilbermanometer,
E = Elektroden, D = Dreiwegehahn, U = Schaltkontakte.

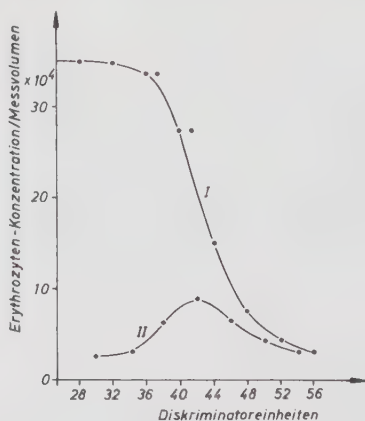


Abb. 2: Integralkurve (I) und Differentialkurve (II) der
Volumenverteilung einer Erythrozytenpopulation.

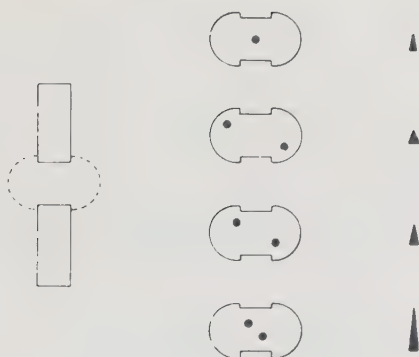


Abb. 3: Schema des kritischen Volumens der Kapillaröffnung und der Widerstandsänderung durch mehrere in diesem Bereich befindliche Partikel nach BRECHER.

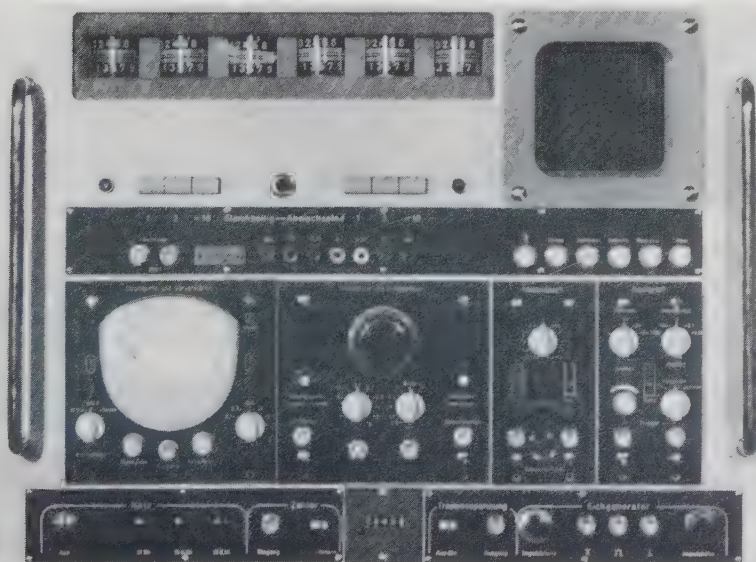


Abb. 4: Frontplatte des neu entwickelten Gerätemodells (Diplomarbeit J. Gutmann).

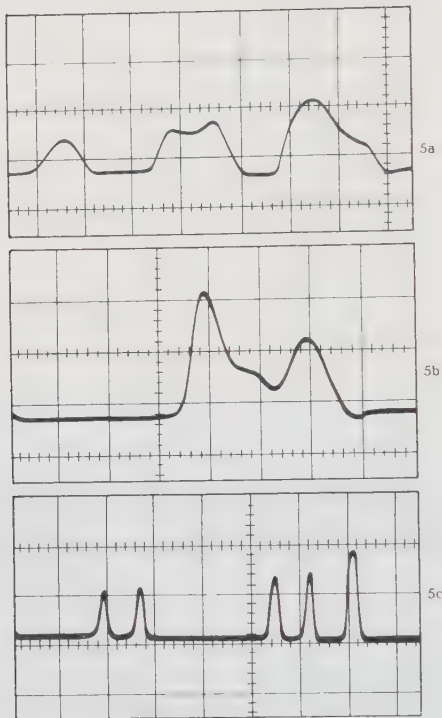


Abb. 5: Darstellung nach dem Coulterschen Prinzip registrierter Zellen. Darstellung der Originalimpulse auf einem Tektronix-Oszillografen.

a und b) Einfach- und Mehrfachdurchtritte in unterschiedlich dichter Aufeinanderfolge (Maßstab: 20 usec/ Skalenteil).

c) Impulsbild bei stärkerer Blutverdünnung (Maßstab: 100 usec/Skalenteil).

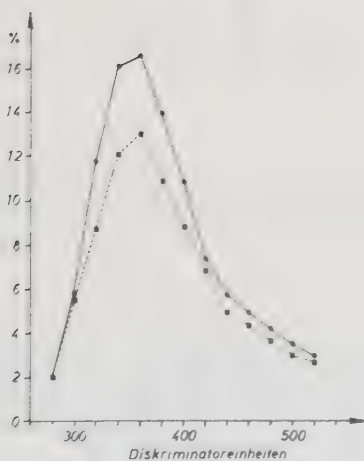


Abb. 6: Volumenverteilungskurve einer menschlichen Erythrozytenpopulation vor und nach Kapillarpassage.

—— Erythrozyten vor der Passage (1. Durchlauf)
----- Erythrozyten nach der Passage (2. Durchlauf)

Gleichbleibende Volumenverteilung bei methodisch bedingter stärkerer Verdünnung im 2. Durchlauf.

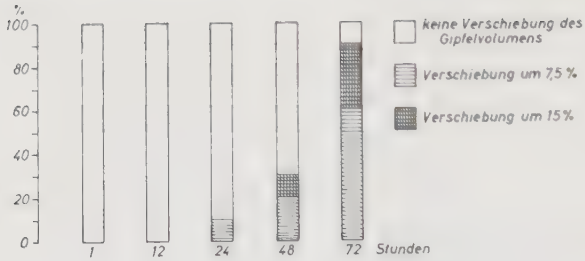


Abb. 7: Einfluß der Aufbewahrungszeit bei 4° C auf das Gipfelvolumen einer menschlichen Erythrozytenpopulation.

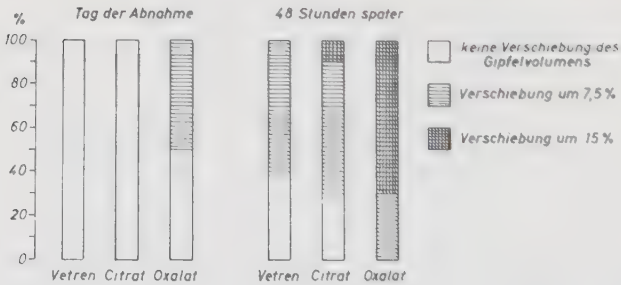


Abb. 8: Einfluß des gerinnungshemmenden Mittels auf das Gipfelvolumen einer menschlichen Erythrozytenpopulation.

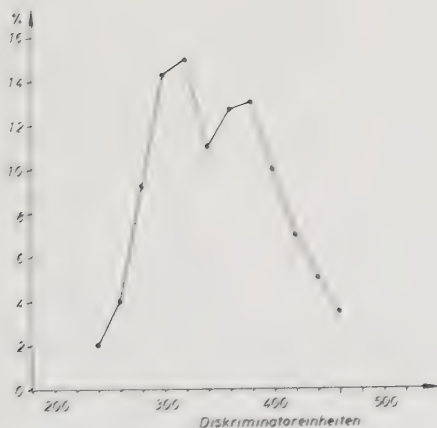


Abb. 9: Zweigipflige Verteilungskurve des Erythrozytenvolumens bei einem gesunden Blutspender. Messung am neuen Gerät, Abstand der Gipfel etwa 8 μ^3 .

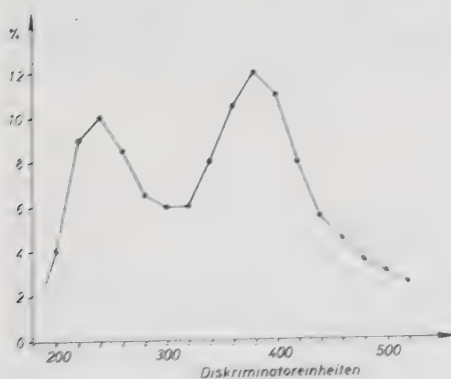


Abb. 10: Volumenverteilungskurve einer im Verhältnis 1 : 1 gemischten Suspension von Human- und Mäuseblut.

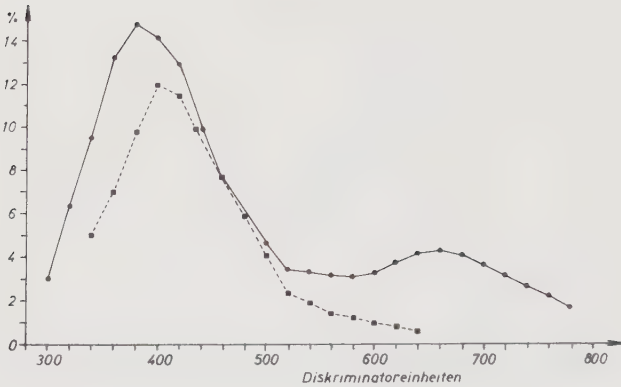


Abb. 11: Volumenverteilungskurve in physiol. Kochsalzlösung und in Gowerscher Lösung aufgeschwemmter menschlicher Erythrozyten.

—— Erythrozyten in gepufferter Kochsalzlösung
----- Erythrozyten in Gowerscher Lösung

Wert nach 1 Stunde; bei Sofortvermessung liegt der Verteilungsgipfel in Gowerscher Lösung um 40 Diskriminatoreinheiten nach rechts verschoben.

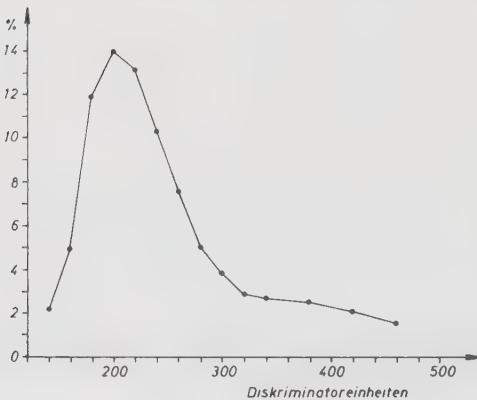


Abb. 12: Volumenverteilungskurve einer menschlichen Leukozytenpopulation (Verstärkungsfaktor $\times 0,2$).

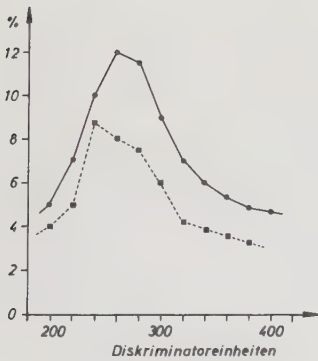


Abb. 13: Volumenverteilungskurve der Spermien zweier Bullen (Ejakulat).

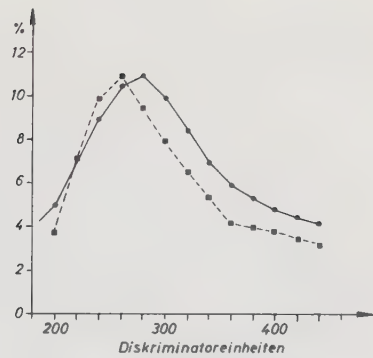


Abb. 14: Volumenverteilungskurve der Spermien zweier Eber (Ejakulat).

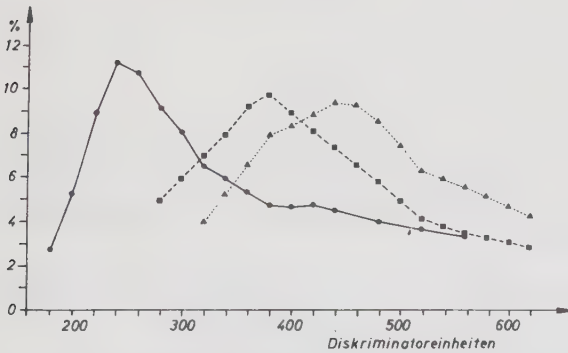


Abb. 15: Volumenverteilungskurve der Spermien aus Nebenhodenkopf, Nebenhodenschwanz und Ejakulat eines Bullen.

— Spermien aus dem Ejakulat
 - - - Spermien aus dem Nebenhodenschwanz
 Spermien aus dem Nebenhodenkopf

Literatur

1. Leeuwenhoek, A. de: Philos. Trans. 10 (1675) 380
2. Vierordt, K.: Arch. phys. Heilk. 11 (1852) 26, 327, 546, 854
3. Price-Jones, C.J.: Red Blood Cell Diameters (London 1933)
4. Coulter, W.H.: Nat. Electron. Conference, Chicago 1956
5. Bürker, H.: Pflügers Arch. ges. Physiol. 107 (05) 426
6. Günther, H.: Dtsch. Arch. klin. Med. 162 (29) 215
7. Günther, H.: Folia haemat. 35 (29) 383
8. Herrnberg, C.A.: Acta med. scand., Suppl. (41) 122
9. Pijper, A.: Med. J. South Africa 14 (18) 211
10. Bock, H.E.: Klin. Wschr. 10 (33) 1141
11. Lagercrantz, C.: Nature 161 (48) 25; Acta physiol. scand. 26 (52) 93
12. Wolff, H.S.: Nature 165 (50) 967
13. Crosland-Taylor, P.J.: Nature 171 (53) 37; Blood 13 (58) 388
14. Ponder, E.: Hemolysis and related Phenomena (New York 1948)
15. Loeschcke, H.H., R. Wever: Pflügers Arch. ges. Physiol. 253 (51) 533
16. Brecher, G., et alii: Ann. N.Y., Acad. Sci. 99 (62) 242
17. Kubitschek, H.E.: Research 13 (60) 128
18. Pfeiffer, G.: Z. med. Lab. Techn. 3 (62) 57
19. Ruhenstroth-Bauer, G., K.D. Zang: Blut 6 (60) 446
20. Brecher, G., et alii: Amer. J. clin. Path. 26 (56) 1439

21. Ruhenstroth-Bauer, G., P. Sachtleben: Med. Grundlagen-
forschung Bd. II (1959)
22. Sørensen, S.P.L.: Biochem.Z. 22 (09) 352
23. Michaelis, L.: Biochem. Z. 234 (31) 139
24. Gowers, W.R.: Lancet 797 (1877 I)
25. Kleine, N.: Ärztl. Laborat. 6 (60) 313, 7, (1961) 133
26. Akeroyd, J.H. et al.: Amer. J. clin. Path. 31 (59) 188
27. Otis, R.D., R. Tennant: Amer. J. clin. Path. 35 (61) 383
28. Richar, W.J., E.S. Breakell: Amer. J. clin. Path. 31 (59) 384
29. Glover, F.A., L.W. Phipps: J. Reprod. Fertil. 4 (62) 189
30. Segal, S.J., K.E. Laurence: Ann. N.Y. Acad. Sci. 99 (62) 271

L e b e n s l a u f

- 28.10.1937 geboren in Oppeln/Oberschlesien als Tochter von Dr. Ing. Friedrich Karl Buchholz und seiner Ehefrau Waltraut geb. Ecke.
- 1944 - 1948 Besuch der Volksschule in Kattowitz/Oberschlesien, Oberstdorf, Allach und München.
- 1948 - 1956 Besuch der Oberrealschule in München, ab 1952 in Bilbao (Spanien).
- Juni 1956 Abitur an der deutschen Oberschule Bilbao.
- WS 1956 - WS 1963 Studium an der Universität München.
Physikum im SS 1959.
Staatsexamen im Juni 1963.
- 1.11.1960 - 31.12.1964 Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie in München.

